

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-508881

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)10月5日

(51)Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/02	Z N A C	9282-4 B	
C 1 2 N 1/19		8828-4 B	
9/90		9152-4 B	
15/09		9281-4 B	C 1 2 N 15/ 00 A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願平6-501587	(71)出願人	メルケ エンド カンパニー インコーポレーテッド アメリカ合衆国, ニュージャーシ 07065, ローウエイ, イースト リンカー ン アヴェニュー 126
(86) (22)出願日	平成5年(1993)6月2日	(71)出願人	ユニバーシティー・オブ・ケント・アツト・カンタベリー イギリス国、ケント・シー・テイー・2・7・エヌ・ゼット、カンタベリー、ザ・レジストリー (番地なし)
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)12月12日	(74)代理人	弁理士 川口 義雄 (外2名)
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 3 / 0 5 3 1 8		
(87)国際公開番号	W O 9 3 / 2 5 6 7 6		
(87)国際公開日	平成5年(1993)12月23日		
(31)優先権主張番号	9 0 1 , 7 1 3		
(32)優先日	1992年6月12日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 サッカロミセスセレビシアエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の産生を増加させる方法

(57)【要約】

酵母によって産生されるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質、特に組換え分泌タンパク質の収率を増加させる方法を開示する。タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (P D I) 酵素は分泌及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の形成を触媒する。ここでは、ヒト P D I 又は酵母 P D I を調節的に過剰産生する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の組換え株の構築を開示する。これらの株は、治療面で潜在的に重要なジスルフィド結合をもつタンパク質を極めて多量に分泌する。これらの株は、ジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質の産生を増加させる可能性を有する。

請求の範囲

1. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、
 - (a) 組換え宿主内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを発現させるステップ、及び
 - (b) 前記組換え宿主内で、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を発現させるステップ
 を含むことを特徴とする前記方法。
2. ステップ(a)でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え宿主が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素をコードする組換え発現カセットのコピーを一つ以上含む請求項1に記載の方法。
3. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項2に記載の方法。
4. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが宿主細胞プラスミド上に含まれている請求項2に記載の方法。
11. 酵母が Sacccharomyces cerevisiae 又は Cryptococcus neoformans 科の種の株である請求項10に記載の方法。
12. 酵母が Saccharomyces 属の種である請求項11に記載の方法。
13. 酵母が Saccharomyces cerevisiae である請求項12に記載の方法。
14. ステップ(b)の組換え遺伝子がアンテスタシムである請求項1に記載の方法。
15. ステップ(b)の組換え遺伝子がマダニ抗凝血タンパク質である請求項1に記載の方法。
16. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項1に記載の方法。
17. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項1に記載の方法。
18. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項17に記載の方法。

5. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が、一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項1に記載の方法。
6. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項1に記載の方法。
7. ステップ(b)のジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項1に記載の方法。
8. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項5に記載の方法。
9. ステップ(a)の組換え宿主が哺乳動物である請求項1に記載の方法。
10. ステップ(a)の組換え宿主が酵母である請求項1に記載の方法。
19. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、
 - (a) 組換え酵母宿主細胞内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを産生するステップ、及び
 - (b) 前記組換え宿主内で、分岐ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子が発現させるステップ
 を含むことを特徴とする前記方法。
20. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項19に記載の方法。
21. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項19に記載の方法。
22. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項21に記載の方法。
23. ステップ(a)でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え酵母宿主が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする組換え発現カセットのコ

ドーを一つ以上含む請求項19に記載の方法。

24. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが酵母宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項23に記載の方法。

25. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが自律的複製プラスミド上に含まれている請求項23に記載の方法。

26. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつタンパク質をコードする組換え遺伝子が一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項18に記載の方法。

27. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項19に記載の方法。

28. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え酵母宿主を30℃以下の温度で増殖する請求項19に記載の方法。

29. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え酵母を約20℃～25℃の温度で

増殖する請求項28に記載の方法。

30. ジスルフィド結合をもつタンパク質がアンテスタシンである請求項29に記載の方法。

31. ジスルフィド結合をもつタンパク質がマジン錠殺菌タンパク質である請求項29に記載の方法。

32. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを産生する酵母 Saccharomyces cerevisiae の株。

33. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の酵母株。

34. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の酵母株。

明 細 書

サッカロミセスセレビシアによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の産生を増加させる方法

発明の背景

タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、分泌タンパク質及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の形成に関わる酵素である。哺乳動物PDIの保存された (conserved) 「チオレドキシン様」活性部位を模倣するように設計されたオリゴヌクレオチド (WCGGCGK) (配列番号: 1) を用いて、本発明者らは下等真核生物 Saccharomyces cerevisiae からPDIをコードする遺伝子を単離した。クローニングした遺伝子のヌクレオチド配列及び推定配列は、分子量9, 082及びpI = 4.1の530アミノ酸からなるタンパク質を予測させるが、これらは哺乳動物PDIの物理的性質である。また、アミノ酸配列は哺乳動物及び鳥類のPDI配列に対して34～32%の同一性と53～56%の類似性を示し、全体的構造が極めて類似しており、特に、各々が還元性である二つの100残基セグ

メントが存在する。哺乳動物及び鳥類のPDIに対する最も大きな相同性は、保存された「チオレドキシン様」活性部位を含む領域 (A, A') にある。N末端領域は機能可能な分画シグナル配列の特徴を有しており、C末端の4個のアミノ酸 (KDEL) (配列番号: 2) は、膜タンパク質がE, cerevisiae 小胞体 (E, R.) の成分であるということと合致している。この遺伝子 (PDI1と称する) の複製のコピーを有する形質転換体は10倍のPDI活性レベルを有し、予測された分子量のタンパク質を過剰発現する。PDI1遺伝子は酵母ゲノム内で非還元性であり、定常期細胞には存在せず、また熱誘導もできない単一の1, 8 kb転写体をコードする。PDI1遺伝子の転写はハプロ致死性 (haplo-lethal) であり、これは該遺伝子の産物が発育能力 (viability) にとって必須のものであることを意味する。

チオール: ジスルフィド交換反応を触媒する酵素であるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、分泌細胞のE, R. 内腔 (lumen) の主な常在タンパク質成分である。該酵素の細胞分布、細胞下の位置及び発現状態に関して立証された一連の事実は、該酵素が分泌タンパ

ク質の生合成である種の役割を果たすことを示唆しており (Freedman, 1984, Trends Biochem. Sci., 9, pp. 438-441), これはその場での (in situ) 直接的架橋結合の研究によって裏付けされている (Rothman & Pierce, 1987, Biochemistry, 26, pp. 4179-82)。PDI を欠失しているミトコンドリアが同時翻訳 (co-translational) グンパク質のジスルフィド形成の特異的欠如を示すという発見は (Bullis & Freedman, 1988, Nature, 336, pp. 649-51), 該酵素が分泌及び細胞表面タンパク質の生合成の間に天然ジスルフィド結合形成の触媒として機能することを意味する。この役割は、該酵素のミトコンドリアの触媒特性について知られている事実、即ち該酵素がチオール:ジスルフィド交換反応を触媒して正味のタンパク質ジスルフィドの形成、貯蔵又は異位化を生起させ、且つ多数にわたる還元され且つ折り畳みのないタンパク質基質においてタンパク質の折り畳み及び本来のジスルフィド結合の形成を触媒することができるという事実と一致している (Freedmanら, 1989, Biochem. Soc. Symp., 55, pp. 167-192)。

該酵素のDNA及びアミノ酸配列は幾つかの種について知られており (Scherena, B.ら, 1991, Yeast, 7, pp. 185-198; Farquhar, R.ら, 1991, Gene, 108, pp. 81-89)、哺乳動物の肝臓から精製して均質にした該酵素の作用のメカニズムに関する情報も増えている (Croisat & Coloma, 1980, J. Mol. Biol., 142, pp. 43-62; Freedmanら, 1988, Biochem. Soc. Trans., 16, pp. 96-9; Gilbert, 1989, Biochemistry, 28, pp. 7298-7305; Lundstrom & Holmstrom, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9214-9220; Hawkins & Freedman, 1990, Biochem. J., 275, pp. 285-309)。組織におけるタンパク質の折り畳み、アッセンブリー及びトランスロケーションの仲介物質として現在推定されている多くのタンパク質因子 (Rothman, 1989, Cell, 58, 591-601) のうち、PDI は明確に規定された

触媒活性を有するという点で希有である。

PDI は哺乳動物の組織から容易に分離され、均質酵素は特異的な酸基 pI (4.0~4.5) を有するホモダイマー (homodimer) (2x57kD) である (Hillisonら, 1984, Methods Enzymol., 107, pp. 283-292)。該酵素はヒムン及び病原 Chlamydomonas reinhardtii から精製された (Kakara, 1990, Biochem. J., 268, pp. 68-68)。活性は広範囲の組織で検出されており、予備報告では、PDI 活性は 3, coreview page において検出可能であると報告された (Williamsら, 1988, FEBS Lett., 2, pp. 133-135)。最近になって、クローニングした cDNA 配列に基づいて由来する多くの PDI の完全アミノ酸配列が報告された。その中には、マウス由来 (Edmanら, 1989, Nature, 332, pp. 267-270)、ウシ由来 (Yamauchiら, 1987, Biochem. Biophys. Res. Comm., 146, pp. 1485-1492)、ヒト由来 (Pinnia Janiemiら, 1987, EMBO J., 6, pp. 643-9)、酵母由来 (Scherena, B.ら, 前出引用文献; Farquhar, R.ら, 前出引用文献) 及びヒヨコ由来 (Parkkonenら, 1988, Biochem. J., 254, pp. 1005-1011) の PDI がある。これらの発現動物種に由来するタンパク質は全体を通して高度の配列保存を来し、いずれも、最初にマウス PDI 配列で精製された幾つかの結合的特徴を示す (Edmanら, 1985, 前出引用文献)。最も顕著なものは、互いに極めて接近であり且つチオレドキシン、即ち還元 Cy 残基の間に形成された活性部位ジスルフィド/ジチオール残基を含む小さいドック型タンパク質に密接に関連した配列を有する残基数約100の二つの領域が PDI 配列中に存在することである。チオレドキシンでは活性部位配列が RCGPCR (配列番号: 3) であり、PDI 中に二つ存在する対応する領域は配列 ^WRCGCR (配列番号: 1) を有する (PDI 配列中で同定された他の変換領域、モチーフ及び恒定性については後で説明する)。

PDI に対応するか又は密接に関連した配列は、ジスルフィド結合の形成以外の機能の分析を目的とする研究で際

定された。例えば、PDIが、E、R、内の新生 (nascent) すなわち新合成 (nascent-synthesized) プロコラーゲンポリペプチドの主な翻訳後修飾を触媒する阻害体 $\alpha_2\beta_1$ 酵素プロリル-4-ヒドロキシラーゼのサブユニットとして作用するという事実が立証されている (Pinn J. J. & J. E. 他, 1987, 前掲引用文献: Kojima, 1987, J. Biol. Chem., 262, pp. 6447-49)。また、PDIが同様の翻訳のN-グリコシル化のシステムに関与することを示唆する事実もあり (Geetha-Habib, 1988, Cell, 54, pp. 63-68)、最近では、該酵素が、トリグリセリドを新生分泌リポタンパク質に密接する複合体に関与しているという説も出ている (Wattara, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9800-7)。このように、PDIは分泌タンパク質の同時翻訳及び翻訳後修飾で複数の機能を果たし得る (Freedman, 1989, Cell, 57, pp. 1069-72)。

哺乳動物分泌タンパク質の大多数は、複数の分子内及び/又は分子間ジスルフィド結合を有している。非限定例を

要がある。通常は、天然タンパク質の生成速度及び実可能な最適収率はどちらも、分子内ジスルフィド結合の増加に伴って低下する。この問題は、各ドメインが折り畳まれてそれぞれの天然ジスルフィド結合を確立して形成しなければならない複数のジスルフィド結合ドメインを含むタンパク質 (例えば組織プラスミノゲン活性化因子) ではより重大である。

In vivo のジスルフィド結合形成プロセスは、翻訳と同時に、又は極めて早期の翻訳後事象として発起する。哺乳動物細胞のE、R、内腔の修飾及び新合成分泌タンパク質の研究では、天然ジスルフィド結合が既に形成されていることが判明している。*In vivo* のプロセスは、分泌細胞内に豊富に存在するタンパク質であり小胞体の内腔面 (luminal space) に局在する酵素、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼによって触媒されると思われる (Freedman, R. B., 1984, *Trends in Biochemical Sciences*, 2, 438-441)。この酵素は *in vitro* で、広範囲のタンパク質諸質においてチオール:タンパク質-ジスルフィド交換反応を触媒し、天然タンパク質ジスルフィ

ド形成の知見として、下唇体車ルセン、インターロイキン、免疫グロブリン、プロテアーゼ及びその阻害物質、並びに他の血漿タンパク質が挙げられる。この種のタンパク質は産業的造紙工学の主要標的の一つであるが、細菌及び肝臓内でのこれらのタンパク質の発現における初期の体験では、これらのタンパク質を悉数的に活性な組織反応物として得る上で多くの問題があることが指摘された。その結果、一般的には翻訳後修飾、特定のにはタンパク質の折り畳み及びジスルフィド結合形成をより深く解明する必要があるようになった。

単一の折り畳みドメインを有するジスルフィド結合をもつタンパク質は通常、正値にジスルフィド結合した状態を最適な収率で形成するために、完全に還元、酸化し、次いで *in vitro* で再生することができる。このプロセスでは、ゆわくり異性化して天然のジスルフィド結合を生成する多くの機にジスルフィド結合した形態の混合集団が迅速に形成される。該プロセスは、チオール/ジスルフィド酸化還元酵素族 (例えばGSN及びGSOG) 及びアルカリ性pHによって触媒される。沈殿及び後置ジスルフィド形成を防止するためには、タンパク質濃度を低くする必

要がある。天然タンパク質の生成速度及び実可能な最適収率はどちらも、分子内ジスルフィド結合の増加に伴って低下する。この問題は、各ドメインが折り畳まれてそれぞれの天然ジスルフィド結合を確立して形成しなければならない複数のジスルフィド結合ドメインを含むタンパク質 (例えば組織プラスミノゲン活性化因子) ではより重大である。

In vivo のジスルフィド結合形成プロセスは、翻訳と同時に、又は極めて早期の翻訳後事象として発起する。哺乳動物細胞のE、R、内腔の修飾及び新合成分泌タンパク質の研究では、天然ジスルフィド結合が既に形成されていることが判明している。*In vivo* のプロセスは、分泌細胞内に豊富に存在するタンパク質であり小胞体の内腔面 (luminal space) に局在する酵素、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼによって触媒されると思われる (Freedman, R. B., 1984, *Trends in Biochemical Sciences*, 2, 438-441)。この酵素は *in vitro* で、広範囲のタンパク質諸質においてチオール:タンパク質-ジスルフィド交換反応を触媒し、天然タンパク質ジスルフィド形成の知見として必要とされる特徴を有する (Freedman, R. B., 1984, *Biochem. Soc. Trans.*, 12, 989-942)。該酵素の役割を明らかにする別の事項としては、(i) 該酵素の組織分布がジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成のそれと合致するという事実 (Brockway, B. E., 1980, *Biochem. J.*, 191, 873-876)、及び(ii) 多くの系で、存在する酵素の量が、ジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成速度の生理学的変化に平行して変化するという事実 (Brockway, B. E., 1980, *Biochem. J.*, 191, 873-876; Freedman, R. B., 1983, "Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological & Clinical Aspects", A. Larsson, S. Orrenius, A. Holmgren & B. Mannervik編, Raven Press, New York, pp. 271-282; Paver, J. L., 1989, *FEBS Letters*, 242, pp. 257-

382) が挙げられる。

該酵素の特性は、多くの動物系 [Lambert, N., 及び Freedman, R. B., 1983, Biochem. J., 213, pp. 225-234] 及びコムギ [de Azevedo, G. M. V. ら, 1983, Biochem. Soc. Trans., 12, 1043] で説明されており、分子特性及び動力学的特性の顕著な保存が観察された [Freedman, R. B. ら, 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, pp. 939-942; Brockway, B. E. 及び Freedman, R. B., 1984, Biochem. J., 219, 51-59]。しかしながら、該酵素は、アモニ核生物又は細菌においてはまだ十分に研究されていない。少なくとも一部の酵母分泌タンパク質 (例えばモナー素) はジスルフィド結合を含んでいるため、酵母と高等真核生物との間の、分泌に関与するメカニズム及び分子成分の高度の相同性は、該酵素又は類似体が酵母内に存在することを強く示唆させる。

商業的に重要な哺乳動物タンパク質の発現のための万能宿主 (versatile host) としての酵母の使

用レベルの PDI を産生する宿主細胞と比べて実質的に増加する。

図面の簡単な説明

第1図は、マルテコビープラスミド上に酵母 PDI をコードする遺伝子を有する *S. cerevisiae* 形質転換体の無細胞溶出液の SDS-PAGE 分析を示している。

第2図は、「COMPARE」及び「DOTPLOT」ソフトウェア (UWGCG) を用いた酵母 PDI とラット PDI との間のドットプロットアラインメント (dot plot alignment) を示している。哺乳動物 PDI のドメイン構造は同じ細尺で前述アラインメントの下に示されている。

第3図は、酵母 PDI 遺伝子の発現に関するストラテジー及び結果を示している。パネル (b) は、pdi1::His3 誘導に対して異型接合体の His⁺AS23 24 株の四分子 (tetrad) 分析の結果を示す。

第4図はプラスミド pUC18 の構造を示している。

第5図はプラスミド pUC-ySP-hPDI の構造を示している。

第6図は、pUC18-GAL10p (5) ADHI1

目は、酵母分泌産物の限定された能力、及び該能力と高等真核生物のそれとの相違 (例えばグリコシル化における相違) によって、ある程度の変換を強いられる。

本発明は、酵素タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する組換え宿主細胞内でジスルフィド結合タンパク質を産生するための新規の方法と、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する組換え酵母細胞とを提供する。本発明は、ジスルフィド結合をもつ組換え分泌タンパク質の分泌を実質的に五つ子増強に増加させる組換え酵母宿主細胞も提供する。

発明の概要

ヒト及び酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) をコードする DNA を単離し、プロモーターと転写ターミネーターとを含む発現カセット又はベクターにクローニングする。PDI をコードする DNA を含む発現カセット又はベクターを宿主細胞内にトランスファーすると、該細胞は PDI タンパク質を過剰産生する。これらの PDI 過剰産生細胞を、ジスルフィド結合をもつタンパク質の発現のための組換え宿主として使用する。ジスルフィド結合をもつタンパク質の分泌は、PDI 過剰産生宿主細胞では、

としても知られているプラスミド p401 の構造を示している。

第7図はプラスミド pUC18-GAL10p-yPDI-ADHI1 の構造を示している。

第8図は、KH42/ATS としても知られているプラスミド pKH42/ATS の構造を示している。

第9図は YSP24-GAL10p-yPDI の構造を示している。

第10図は YEP24-GAL1p-MFα-hPDI の構造を示している。

第11図は pUC-GAL1/10-hPDI/ATS の構造を示している。

第12図は pUC-GAL1/10-yPDI/ATS の構造を示している。

発明の詳細な説明

終極におけるタンパク質の折り畳み及び分泌のプロセスは極めて複雑であり、遺伝子研究に基づいて言えば、30以上の遺伝子産物が関与している (Frascausoff, A. ら, 1991, Methods Enzymology, 194, pp. 662-674)。これらの産物とし

では、ペプチジルプロリルシーストランスイルメラーゼ、PDI及び他のチオレドキシソキシタンパク質、BiP、種々の分子シャペロン (molecular chaperone) (hsp70, hsp90等)、シグナルペプチダーゼ、シグナル認識タンパク質、E. R. への翻訳後のトランスロケーションに関与する種々のタンパク質、E. R. の種々の構造及び機能成分、ゴルジ (Golgi)、並びにまだ特徴が解明されていない分泌小胞及び多くのタンパク質が挙げられる (Franzoso *et al.*, A. *ら*, 1991, 出引用文献: Rothman, J. E. 及び Orci *ら*, 1992, *Nature*, 355, pp. 409-415; Gething, M. G. 及び Sambrook, G., 1992, *Nature*, 355, pp. 83-85)。このような複雑さの中で、単一の成分 (即ちPDI) の量が増加するだけで特定の異種タンパク質の分泌が実質的に増加するという可能性は、当業者には極めて想到しにくいことと思われる。そこで本発明は、PDIの量が増加しただけで、例えばアンチスタチンのような分泌タンパク質の量が有意に且つ実質的に増加するという極めて意外な結果を提示した。これは、タンパク質の折り畳

みに、本発明では別の路徑を主、例えば非限定的具体例として哺乳動物細胞、植物細胞、細菌のような原核生物の細胞、昆虫細胞、並びに酵母及び糸状菌類のような下等真核生物の細胞と適用し得る。また、これも当業者には明らかなように、酵母及びヒト細胞以外の細胞に由来するPDIコードニングDNAの使用も本発明の範囲内に包含される。PDIコードニングDNAの別の構造の非限定的具体例としては、ヒト以外の脊椎動物、例えばラット及びマウス、非脊椎動物、例えば昆虫、並びに下等真核生物、例えば菌類が挙げられる。

Rothblatt及びMeyerの方法 (1986, *Cell*, 44, pp. 619-28) の方法で 5, 6 reviewed から調製したミクロソーム膜フラクションは低レベルのタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 活性を有していたが、該レベルは蓄液処置によって8~20倍増加した。これは、脊椎動物の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI (Mills *ら*, 1983, *Biochem. J.*, 213, pp. 245-8); Lambert及びFreeman, 1985, *Biochem. J.*, 228, pp. 635-45) 及びコムギ

及びノ又はジスルフィド結合形成の促進に関連していると思われる現象である。

本発明は、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) をコードするDNAを過剰発現させることにより、組織宿主細胞による組織タンパク質の産生を増加させる方法を提示する。本明細書中のPDIは、分子内及び分子間ジスルフィド結合の形成を特異的に触媒する酵素を意味する。

幾つかの種に由来するPDI遺伝子のDNA配列は当業者で知られている。これらの種の非限定的具体例としては、ヒト、ウシ、ラット、ニワトリ及び酵母が挙げられる。

(Mizunaga *ら*, 1990, *J. Biochem.*, 108, pp. 846-851; Scherrens *ら*, 1991, *Yeast*, 7, pp. 185-193)。

PDIをコードするDNAの単離における出発材料は従来の種類の細胞又は組織であってよく、非限定的具体例としては、哺乳動物及び他の脊椎動物の細胞及び組織、並びに下等真核生物の細胞及び組織が挙げられる。ここでは本発明を、組織と酵母宿主細胞内で発現される酵母及びヒトPDIを用いて説明する。当業者には容易に理解されるよ

の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI (Rodon *ら*, 1982, *FEBS Lett.*, 138, pp. 121-4) と類似の酵素が、該酵母の細胞体の内腔に存在することを示唆するものであった。高等真核生物酵素に対して相対的に、PDIをコードする遺伝子をクローニングした。高度の保存を示す可能性が最も高い領域は、脊椎動物PDIにおいて高度に保存されており、特に二つの機能性ジチオール基部位の領域でチオレドキシソに対して極めて強い相関を示すa及びa'ドメインであると思われる。活性部位の共通配列はFYNFWDGHCX (配列番号: 4) である (Parkkonen *ら*, 1988, 出引用文献)。非還元性30マーオリゴヌクレオチドを酵素コードンバイアス (bias) に基づいて選択し (Sharp *ら*, 1986, *Nucleic Acids Res.*, 14, pp. 5125-43)、これを示差精製して、マルチコピーYEPプラスミドpMA30内で構築した酵母ゲノムライブラリーのスクリーニングに使用した (Crouzet及びTuite, 1987, *Mol. Gen. Genet.*, 210, pp. 581-3)。スクリーンから二つの極めて稀性のクローン (C7及びC10と称する) が同

収され、予備制限地図を作成した結果、挿入体サイズはそれぞれ1.4 kb及び1.4, 5 kbであり、二つの挿入体は共通の制限部位をいくつか有することが判明した。クロームC7の挿入物を更に分析した。

クロームC7が確かにPDIをコードすることを確認するために、酵母*S. cerevisiae*株MD40/4c [*a* *trp1* *ura2* *his3* *leu2* : *Tru* *ite* *r*, 1986, E. M. B. O. J., 1, pp. 693-698] をクローム7及び質プラスミドpMA3cで形質転換した。8cのS-PAGE分析の結果、C7形質転換株は、主要5.8 kDaポリペプチドを過剰発現し、おそらくは約7.7 kDaの第二のポリペプチドも過剰発現することが判明した(第1図)。また、二つの株の無細胞溶解液をPDI活性についてアッセイしたところ、C7形質転換株は10倍のPDI活性レベル(38, 6×10⁻⁴ U/mgタンパク質)を示した。これら二つの事実は、活性部位配列WCPCCK(配列番号: 8)を有する*S. cerevisiae*チオレドキシンは分子量が約12 kDaであるため(Porqueras, 1970, J. Biol. Chem., 245, pp. 2363-70)、C7クロ

ームがPDIをコードし、チオレドキシンをコードしないという見方を裏付けるものであった。

推定上のPDIローディング配列の位置を決定する(*locating*)ために、C7クロームを種々の制限酵素で消化し、消化産物をニトロセルロースにトランスファーし、前述の80マー「活性部位」オリゴヌクレオチドでブローブした。この操作では、5 kbの*Bam*HI-*Sal*Iフラグメントと、それぞれ5, 9及び4, 5 kbの二つの明らかに隣接している*Hind*IIIフラグメントとが同定された。後者のパターンは、活性部位のコピーを二つ含むPDIについて予測されるであろうように、「活性部位」ブローブの機能的に二つ存在し得ることを示唆するものであった。二つの*Hind*III部位からの予備DNA配列分析では、有性動物PDIに対して弱い相同性を示す断片(ORF)の存在が明らかにされたが、これらは遺伝配列ではないため、他にも*Hind*III部位が存在するに違いないことも判明した。この推測は、詳細な制限地図の作成とDNA配列決定とによって確認された。天然の制限部位とオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、二つの隣接*Hind*III部位を含む2, 6 kbの*Hind*III

II-*Eco*RIフラグメントの配列決定を両方の株で行った。

DNA配列は、予測された分子量39, 082の、530アミノ酸をもつポリペプチドをコードすることができる1593bpの単一断片の存在を予測させた(Farquhar, R., 前出引用文献、第2図参照)。該断片は、適度に多いタンパク質をコードする酵母mRNAに典型的なコドンバイアスを有していた(Bennett & Hall, 1982, J. Biol. Chem., 257, pp. 3029-3031)。コドンバイアス指数(codon bias index)の計算値は0.80であった。

決定されたヌクレオチド配列の分析は、多数の標準的酵母プロモーター及びターミネーターを明らかにした(Farquhar, R., 前出引用文献、第2図参照)。これらのモチーフは、断片に対して-100と-128との間に位置する(TA)₂配列の一部分としてのTATTAボックス様間部位と、位置-291と-298との間のポリミジンに富んだ領域(37ヌクレオチドのうちの34)とを含む。断片の3'末端には、TAA

終止ターミネーターに関して、*S. cerevisiae*内での転写終結及び/又はポリAデニル化のシグナルと仮定される配列(Zaret及びSierman, 1982, Cell, 28, pp. 568-73)、並びに真核生物ポリAデニル化部位(Proudfoot及びBrownlee, 1976, Nature, 264, pp. 211-4)の両方に対する相同が存在する。

該クローム化遺伝子が転写されたかどうかを調べるために、断片に対して内側の800bp *Hind*III-*Sma*Iフラグメントを用いて、二つの異なる炭素源、グルコース及びアセートで、異なる増殖サイクル段階まで増殖させた*S. cerevisiae*の二つの異なる株(MD40/4c及びSKQ2c [*a*/*a* *ade1*/*ade2* + *his1*/*+*; Gassion, 1979, J. Biol. Chem., 254, pp. 3965-3969])から調製した全RNA試料のノーザンブロットをブローブした。指数増殖細胞では、グルコース及びアセート増殖細胞で単一の1, 8 kb転写体が検出されたが、非増殖細胞では転写体は殆ど検出できなかった。転写体のサイズは、mRNAの5'及び3'領域内の非翻訳配列の

約200ヌクレオチドを考慮に入れて、読取り時により予測された通りであった。

予測されたアミノ酸配列は、下記の理由によって誤配列が正にPDIであることを強く示唆した：

- (i) 予測された59kDaの分子量と、哺乳動物PDIに特徴的なPI(4, 1)とを有していた；
- (ii) 該アミノ酸配列は、BESAFIソフトウェア(GWGCQ, University of Wisconsin)によって決定されたように、先に報告された哺乳動物及び鳥類のPDI配列に対して、80～82%の全体的同一性と、58～56%の全体的類似性を示した；
- (iii) 該アミノ酸配列中の位置58～66及び403～430に「ナオレドキシジン様」活性部位の二つのコピーを含んでいた。また、これらの配列は、哺乳動物PDI内の重複a/a'領域に対して高度のアミノ酸同一性を示す約100アミノ酸のより大きい内部重複(internal duplication)の一部であった(第2図)。酵母及び哺乳動物PDI配列を比べると(a) signment)、a及びa'領域の外側に、大きな相関を示す別の領域が存在することも明らかになった(第2図)。

G, F, ら, 19814, Nucleic Acids Res., 12, pp. 1049-1068)を有する1.8kbのSamHIフラグメントがPDIコーティング配列内のSecRV部位に挿入されている(第3図)ヌク(null)対立遺伝子を同定した。his3二倍体酵母S. cerevisiae株(A53324:[Spalding, A., 1988, Ph. D. Thesis, University of Kent])を、pdi1::HIS3破壊を有するDNAフラグメントで形質転換して、PDI遺伝子の二つの染色体コピーのうちの一つを前記非機能性対立遺伝子で置換した。三つのHIS⁺A53324形質転換体(Y1, Y2及びY3)を更に調べた。いずれの場合も、二倍体の孢子形成は断分子当たり二つの生存可能孢子を生産しただけであり(第3図)、これらは総てhis⁺であった。この結果は、致死型変異がpdi1::HIS3突然変異に関連していたことを示すものである。正確な遺伝子置換がHIS⁺形質転換体Y1及びY2において生じたことは、800bpのHindIII-SacIフラグメントをプローブとして用いる、PstIで消化したブロットされた酵母ゲノムDNAへのサザンハ

また、コードされたポリペプチドの割の二つの特徴は、これがS. cerevisiae小胞体の成分であることを示唆している。該タンパク質は、推定上の分泌シグナルの特徴を有する著しく疎水性のN-末端配列をコードし(Gierasch, 1989, Biochemistry, 28, pp. 923-930)、四つのC末端アミノ酸は酵母PIPのそれと同じであり(Normingtonら, 1989, Cell, 57, pp. 1223-36)、S. cerevisiaeの小胞体保持シグナルであると報告されている(Pelhamら, 1988, EMBO J., 7, pp. 1757-62)。

本発明者らは、クローン化S. cerevisiae PDI遺伝子をpdi1と命名した。このS. cerevisiae pdi1遺伝子はゲノム内のただ一つのコピーに存在する。これは、前述のG, 8kb HindIII-SacIフラグメントを種々のゲノム消化試薬に対するプローブとして用いる高解縮ハイブリダイゼーションにより確認された。

単一のPDI遺伝子が生存能力によって必須であるかどうかを調べるために、HIS3遺伝子(Montiee,

イブリダイゼーションにより確認された。PDI遺伝子は内部PstI部位を含まないが(第3図)、HIS3遺伝子は単一PstI部位を含むため(第3図)、これで2dii::HIS3対立遺伝子は厳密に同定される者である。予測されたように、非形質転換株A53324では単一の9kb PstIフラグメントが検出されたが、Y1及びY2形質転換体では9kb及び2, 2kbという二つのバンドが、由来の異なる二つのバンドからなると推測される9kbバンドと共に検出された。これらのデータは、二つの染色体のうち一方の染色体上のPDI遺伝子がHIS3対立遺伝子で置換され、このような事象がハプロ致死であることを立証するものである。

酵母PDIをコードするDNAを分子的にクローニングするためには、種々の方法のうち任意のものを採用し得る。これらの方法の非限定的具体例としては、適当な発現ベクター系内でのPDI含有DNAライブラリーの複製に次ぐ、PDI遺伝子の直接的機能発現が挙げられる。別の方法は、バクテリオファージ又はプラスミドシールドベクター内で構築したPDI含有DNAライブラリーを、PDIタンパク質のアミノ酸配列から転写した膜タンパク質ナオリボ核酸

ゲドプローブでスクリーニングすることからなる。好ましい方法は、プラスミドシャトルベクター内で構築したヒト又は酵母PDI含有ゲノムDNAライブラリーを、酵素活性部位の既知のアミノ酸配列をコードする検定DNAプローブでスクリーニングすることからなる。

当業者には容易に理解されるように、別のタイプのライブラリー、及び別の細胞又は細胞タイプから構築したライブラリーもPDIをコードするDNAの単離に有用であり得る。別のタイプのライブラリーの非限定的具体例としては、酵母細胞以外の別のヒト、脊椎動物及び下等無脊椎動物細胞又は細胞系に由来するcDNA及びゲノムDNAライブラリーが挙げられる。

当業者には明らかなように、適当なライブラリーは、PDI活性を有する細胞又は細胞系から調製し得る。PDI-cDNAを単離するためのcDNAライブラリーの形成で使用する細胞又は細胞系の選択は、前述の方法を用いて、最初に細胞結合PDI遺伝子を測定することにより実施し得る。

cDNAライブラリーの形成は当業者によく知られている標準的方法で実施できる。良く知られているcDNAラ

イブラリーを形成するためのcDNAライブラリーの形成で使用する細胞又は細胞系の選択は、前述の方法を用いて、最初に細胞結合PDI遺伝子を測定することにより実施し得る。

本明細書では、発現ベクターは、遺伝子のクローニングコピーの転写と、mRNAの適当な宿主内での翻訳に必要なDNA配列であると定義される。この種のベクターは、細菌、真菌、植物細胞、酵母、昆虫細胞及び動物細胞のような種々の宿主内で真核生物遺伝子を発現させるのに使用し得る。

特異的に設計したベクターは、例えば、遺伝子-酵母又は細菌-動物細胞間のDNAのシャトリングを可能にする。通常に構築した発現ベクターは、宿主細胞内の自発的複製のための複製起源と、選択可能なマーカーと、遺伝子の有用な制御要素部位と、高コピー数へのポテンシャルと、強いプロモーターとを含んでいる必要がある。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させRNA合成を開始させるDNA配列であると定義される。強力なプロモーターは、mRNAが高頻度でイニシエートされる

ようにするプロモーターである。発現ベクターの非限定的具体例としては、クローニングベクター、変換されたクローニングベクター、特異的に設計されたプラスミド又はウイルスが挙げられる。

哺乳動物細胞内で細胞PDIを発現させるためには、種々の哺乳動物発現ベクターを使用し得る。細胞PDI発現に適する市販の哺乳動物発現ベクターの非限定的具体例としては、pMC1neo (Serratagene)、pXT1 (Serratagene)、pSG6 (Serratagene)、EBOPSV2-neo (ATCC 37583)、pSPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pdpV-MMT-neo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUC2sg (ATCC 37460) 及びpZD35 (ATCC 37565) が挙げられる。

PDIをコードするDNAを適当なゲノムDNAライブラリーから単離し得ることも当業者には明らかである。ゲノムDNAライブラリーの構築は当業者によく知られている標準的方法で実施できる。良く知られているゲノムDNAライブラリー構築方法は、Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982) に記載されている。

前述の方法で得たクローニングPDIは、細胞PDIを産生するために、適当なプロモーターと別の適当な転写調

子とを結合させる必要がある。細胞PDIを産生させるためには、種々の哺乳動物発現ベクターを使用し得る。細胞PDI発現に適する市販の哺乳動物発現ベクターの非限定的具体例としては、pMC1neo (Serratagene)、pXT1 (Serratagene)、pSG6 (Serratagene)、EBOPSV2-neo (ATCC 37583)、pSPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pdpV-MMT-neo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUC2sg (ATCC 37460) 及びpZD35 (ATCC 37565) が挙げられる。

細胞PDIをコードするDNAはまた、種々の細胞系や細胞内での発現のために発現ベクターにクローニングし得る。細胞PDIを産生させるためには、種々の哺乳動物発現ベクターを使用し得る。細胞PDI発現に適する市販の哺乳動物発現ベクターの非限定的具体例としては、pMC1neo (Serratagene)、pXT1 (Serratagene)、pSG6 (Serratagene)、EBOPSV2-neo (ATCC 37583)、pSPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pdpV-MMT-neo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUC2sg (ATCC 37460) 及びpZD35 (ATCC 37565) が挙げられる。

PDIをコードするDNAはまた、種々の細胞系や細胞内での発現のために発現ベクターにクローニングし得る。細胞PDIを産生させるためには、種々の哺乳動物発現ベクターを使用し得る。細胞PDI発現に適する市販の哺乳動物発現ベクターの非限定的具体例としては、pMC1neo (Serratagene)、pXT1 (Serratagene)、pSG6 (Serratagene)、EBOPSV2-neo (ATCC 37583)、pSPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pdpV-MMT-neo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUC2sg (ATCC 37460) 及びpZD35 (ATCC 37565) が挙げられる。

細菌、又は真核生物、例えば非限定的具体例として酵母、哺乳動物細胞、例えば非限定的具体例としてヒト、マウス、サル及び霊長類動物に由来する細胞系、並びに昆虫細胞、例えば非限定的具体例として Drosophila 由来細胞系、及び組換えバキューロウイルス発現系と共に使用される Saccharomyces fragilis

(S.F.) 昆虫細胞であってよい。適切なものとして使用し得る市販の哺乳動物由来細胞系の非限定的具体例としては、CV-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、3T3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C127 (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26) 及び MRC-5 (ATCC CCL 171) が挙げられる。

酵母启动子プロモーターは酵母宿主内での P.D. 遺伝子の転写を開始させる。従って、当業者には容易に理解されるように、任意の酵母启动子プロモーター配列、例えば非限定的具体例として、GAL1、GAL10、GAL7、PG

的にクローニング配列決定した。それぞれのコーディング領域の 5' 末端領域及びプロモーター配列は、3' a c c 遺伝子のコーディング領域に隣接して配置した。これらの実験で、ガラクトースの誘導に必要な十分なプロモーター及び調節配列が決定された。

S. cerevisiae はまた、各々が A.D.H. のアイソザイムをコードする三つの遺伝子を有する。これらの酵素のうちの一つである A.D.H. I は、S. cerevisiae が酸化剤増殖時にエタノールを炭素源として利用する能力に関与している。A.D.H. I アイソザイムをコードする A.D.H. 2 遺伝子の発現はグルコースにより異化代謝物抑制されるため、0.1% (w/v) のレベルのグルコースの存在下では発現の増殖時の A.D.H. 2 遺伝子の転写は実質的に得られない。グルコースが欠失しており且つ非抑制炭素源が存在すると、A.D.H. 2 遺伝子の転写は 100~1000 倍誘導される。この遺伝子を分子的にクローニングして配列決定し、転写の抑制解除 (derepression) に必要な調節及びプロモーター配列を決定した。

アルファ嵌合因子 (alpha mating factor

K1、A.D.H. 1、A.D.H. 2、PGO5 及び GAP491

(TDH3) を利用し得る。また、組換え宿主内での P.D. I の発現をアッセイするために、適当なアッセイシステム、例えばイムノブロット又は RIA もしくはエンザイムイムノアッセイ (EIA) を使用し得ることも当業者には明らかである。

S. cerevisiae は、増殖用炭素源としてのガラクトースの代謝に関与している酵素をコードする遺伝子を三つ有している。GAL1、GAL2、GAL5、GAL7 及び GAL10 はそれぞれ、ガラクトキナーゼ、ガラクトースペルメラーゼ、カステグルコムターゼの遊離アイソザイム、α-D-ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼ及びウリジントホスホガラクトース-4-エピメラーゼをコードする。ガラクトースが存在しないと、これらの酵素の発現はほとんど検出されない。細胞をグルコースで増殖し、次いでガラクトースを培養物に加えると、これらの種類の酵素は RNA 転写のレベルで、少なくとも 1、000 倍だけ (GAL5 は例外であって、約 5 倍に誘導される) 協調的に誘導される。GAL1、GAL2、GAL5、GAL7 及び GAL10 遺伝子を分子

(orf) は、MAT α 細胞と MAT β 細胞との間の接合に必要とされる S. cerevisiae の性フェロモンである。このトリデカペプチドは、組換え細胞内に送られ、グリコシル化され、タンパク質分解的にプロセッシングされて、細胞から分泌される最終成熟形態となるプレプロフェロモンとして発現される。この生化学的経路は、外來トリペプチドの発現ストラテジーとして利用されてきた。アルファ嵌合因子遺伝子は分子的にクローニングされ、プレプロリゲンド配列を有する遺伝子のプロモーターは種々のトリペプチドの発現及び分泌に利用されてきた。また、PGO5 遺伝子プロモーターは低濃度ホスフェートによって誘導し得ることが判明した。これは、酵母内での外來タンパク質の生理学的に調節された発現にとっても有用である。

アルファ嵌合因子プロモーターは、表現型的に強である細胞内でのみ活性を示す。S. cerevisiae には 5' R として知られている四つの遺伝子座があり、これらは α 及び β 情報の通常サイレントの別のコピーの抑制に必要なタンパク質を合成する。この抑制事象を妨害する温度感受性 (ts) 誘導が、これらの遺伝子座のうち少なくとも一つの座の遺伝子座物内に存在する。この突然変異株で

は、35度での増殖が抑制を醸成し、その結果、アルファ融合因子プロモーターが不活性である表現型的に α/α の細胞が生じる。温度を23度にシフトすると、細胞は表現型的に α に戻り、その結果プロモーターが活性になる。10. SJE陽性を有する株の適用は、幾つかの外來ポリペプチドの制御された発現について説明されてきた。

当業者には容易に理解されるように、PDIの発現のための適当な酵母株は応答菌の候補の中から選択される。適当な酵母株の非限定的具体例としては、プロテアーゼ失活及び変化したグリコシル化能力といったような遺伝子型的及び表現型的特徴を有するものが挙げられる。

Saccharomyces属は様々な種からなる。S. cerevisiaeは種々の外來ポリペプチドの転換えDNA仲介発現のための宿主として最も一般的に使用されている。しかしながら、Saccharomyces属の他の種の間の区別は必ずしも明確ではない。これらの種の多くはS. cerevisiaeと交雑することができ、S. cerevisiaeのプロモーターと類似の又は同じプロモーターを有していると思われる。従って、当業者には容易に理解されるように、PDI発現のための宿主株

は、当業者には容易に理解されるように、PDI発現のための宿主の選択範囲は、Saccharomyces科及びAscomycota科の酵母の種、例えば非限定的具体例としてCandida、Hansenula、Kluyveromyces、Pichia、Saccharomycopsis及びTetrahymenaにまで広がる。

発現ベクターは、多くの方法、例えば非限定的具体例として形質転換、トランスフェクション、プロトプラスト融合及び電気穿孔法のうち任意の方法を用いて宿主細胞内に導入し得る。発現ベクター含有細胞はクローニングで増殖し、種々に分析して、PDIタンパク質を産生するかどうかを調べる。PDI発現宿主細胞クローンの同定は、幾つかの方法、例えば非限定的具体例として抗PDI抗体に対する免疫学的反応性、及び宿主細胞結合PDI活性の存在によって実施し得る。

PDI DNAの発現はまた、*in vitro*で産生した合成mRNAを用いて実施し得る。合成mRNAは種々の無細胞システム、例えば非限定的具体例としてコムギ胚芽抽出物及び鶏伏卵血球抽出物中で効率的に翻訳できる

の選択範囲は、Saccharomyces属の別の種、例えば非限定的具体例としてCandida、Hansenula、Kluyveromyces、Pichia及びTetrahymenaにまで広がる。

幾つかの酵母属、例えばCandida、Hansenula、Pichia及びTetrahymenaは、唯一の増殖用炭素源としてのメタノールの利用について類似の代謝経路を有することが判明した。この代謝経路に関与する酵素であるアルコールオキシゲナーゼの遺伝子はPichia pastorisから単離されている。P. pastorisアルコールオキシゲナーゼプロモーターは単離されて、発現のメタノール誘導に敏感であることが判明した。このような誘導可能プロモーターは、酵母内でのポリペプチド発現に有用である。特に、このプロモーターは、P. pastoris内での異種遺伝子の誘導可能な発現用のプラミド上で活性であることが判明した。この観察は、別の酵母属が誘導型のポリペプチドの転換えDNA仲介発現のための宿主として機能する可能性を強調するものである。

と共に、細胞ベースのシステム、例えば非限定的具体例としてカエル卵母細胞内へのマイクロインジェクションで効率的に翻訳できる。

当業者には容易に理解されるように、PDIは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノムに組込まれた転換え発現カセットに由来する転換え遺伝子で発現され得る。また、これも当業者には明らかであろうが、PDIは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで自律的複製プラスミド上に存在する転換え発現カセットに由来する転換え遺伝子で発現され得る。

転換えPDIを発現する転換え宿主細胞は、別の転換え遺伝子の発現のための宿主として使用し得る。本発明の新規の方法は、転換えPDIを産生する宿主細胞内で、ジスルフィド結合をもつ転換えタンパク質をコードするDNAを発見させることにより、ジスルフィド結合をもつ転換えタンパク質の収率を実質的に増進させる。当業者には容易に理解されるように、本発明の方法ではジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質が産生され得る。ジスルフィド結合をもつタンパク質の非限定的具体例としては、分泌されるか又は細胞結合状態を保持するタンパク質が挙げられる。

ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の発現のための組換えDNA構築物は、PDIについて詳述した方法によって形成し得る。当業者には明らかなように、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノムに組み込まれた組換え発現カセットから発現され得る。また、これも当業者には明らかなであろうが、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、菌液培養型プラスミド上に存在する組換え発現カセットから発現され得る。更に、これも当業者には容易に理解されることであるが、PDIをコードするDNA及びジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、同一プラスミド上に存在し得る。ジスルフィド結合をもつ二つ以上のタンパク質が、送込まれたカセットもしくはプラスミド上のカセット、又はこれらの組合わせから同時発現され得ることも当業者には明らかなである。

組換え宿主細胞内でのPDIの発現後は、PDIタンパク質を回収して、タンパク質中のジスルフィド結合の形成

ous binding) という用語は、抗体種が特定の抗原又はエピトープ、例えば前述のようなPDIと結合する能力を得ず、非特異的抗体は、マウス、ラット、モルモット、ウナギ、ヤギ、ウマ等の動物、好ましくはウサギを、免疫アジュバントを用いて又は用いずに、適当な量のPDIで免疫感作することにより産生する。

最初の免疫感作の前に免疫前血清を回収する。許容し得る免疫アジュバントと組合わせたPDIを約0.1mg〜1000mgで各動物に投与する。許容し得る免疫アジュバントの非特異的異体例としては、フロインドの完全アジュバント、フロインドの不完全アジュバント、ミョウバン沈降物、Complete adjuvant preserved 及びIRNAを含む油中水エマルジョンが挙げられる。最初の免疫感作は、好ましくはフロインドの完全アジュバント中の酵素を、皮下(SC)、腹腔内(IP)又はその両方で複数の部位に注射することからなる。各動物から一定の時間間隔、好ましくは一週間隔隔で採血して、抗体力価を測定する。動物には、最初の免疫感作後、ブースター注射をしてもしなくてもよい。ブースター注射をした動物には、通常、同量のフロインド完全アジュバント中酵素を同

量を投与することができる活世型の精製PDIを改修し得る。PDI精製方法は幾つか存在し、後述に述べている。突然変異に由来するPDIの精製について前述したように、組換えPDIは細胞溶解物及び抽出物、又はならし培養培地から、塩分画、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ヒドホキシルアパタイト吸着クロマトグラフィー及び疎水的相相互作用クロマトグラフィーを様々な組合わせて又は僅かに適用して精製し得る。

更に、組換えPDIは、PDIに特異的なモノクローナル又はポリクローナル抗体を用いて形成したイムノアフィニティカラムを用いて、別の細胞タンパク質から分離することができる。

PDIに対する単一特異性抗体を、PDIに対して反応性を示す抗体を含む哺乳動物抗血清から精製するか、又はKohler及びMilstein, Nature 259: 455-459 (1975)に記載の方法を用いて、PDIに対して反応性を示すモノクローナル抗体として製造する。本明細書中の単一特異性抗体は、PDIに対する均一結合特性を有する単一の抗体種又は複数の抗体種であると定義される。本明細書中の均一結合(homologous

一結合)と云える。ブースター注射は、最大力価が得られるまでの特定の期間の間隔で行う。各ブースター感作から約2週間後、又は単一免疫感作の後で約1週間毎に動物から採血し、血清を回収し、アリコートをして-20℃で貯蔵する。

近交系マウス、好ましくはBALB/cをPDIで免疫感作して、PDIと反応するモノクローナル抗体(mAb)を製造する。マウスは、前述のように、IP又はSC経路で、同量の許容し得るアジュバントに混入した約0.5mgの酵素液又は生理食塩水中約0.1mg〜約10mg、好ましくは約1mgのPDIで免疫感作する。好ましくはフロインドの完全アジュバントを使用する。マウスは9日に最初の免疫感作を施し、約3〜約30週間にわたって休息させる。免疫感作したマウスには、リン酸緩衝液生理食塩水のような緩衝液液中約0.1〜約10mgのPDIの投与からなる一回以上のブースター免疫感作を、静脈注射(IV)によって施す。抗体陽性マウスに由来するリンパ球、好ましくは脾臓リンパ球を、当業者に公知の標準的方法で免疫マウスから脾臓を除去することによって得る。脾臓リンパ球と適当な融合相手、好ましくは骨髓瘤細胞とを、安定なハイブリドーマを形成させる条件下で混合して、

ハイブリドーマ細胞を製造する。融合相手の非限定的具体例としては、マウス腎臓腫瘍P3/NS1/A54-1; MP0-11; S-194及びSp2/0が挙げられるが、好ましいのはSp2/0である。抗体産生細胞及び骨髓腫瘍細胞を、約30%〜約50%の濃度で、約1000mOsmol/lのポリエチレングリコール中で融合させる。融合者は公知の方法で、ヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリンを添加したダルベッコ改質イーグル培養液(DMEM)での増殖により、融合したハイブリドーマ細胞を選別する。約34、38及び42日目には物理療法ウェルから上清液を回収し、PDIを抗原として用いる固相イムノアッセイ(SPIRA)のようなイムノアッセイによってスクリーニングし、抗体の産生を調べる。mAbのアイソタイプを調べるために、培養液をOuchterlony沈降アッセイでも検査する。抗体陽性ウェルからのハイブリドーマ細胞を、MacPhersonの軟質凝集技術(Soft Agar Techniques, Tissue Culture Methods and Applications, Kruse及びPeterson編、Academic Press、1973)によりクローニ

製造するための前述の方法は、PDIポリペプチドフラグメント又は完全長さのPDIポリペプチドに特異的な抗体の産生に使用し得る。

抗体がアガロースゲルビーズ支持体との共有結合を形成するようにN-ヒドロキシスチレンイミドエステルで予備活性化したゲル支持体であるAffigal-10(Biorad)に抗体を加えて、PDI抗体アフィニティカラムを形成する。抗体は、スパーサーアームとのアミド結合を介してゲルに結合する。次いで、残りの活性化エステルを1MエジノールアミンHCl(pH8)でクエンチする。カラムを水洗及び0.23MグリシンHCl(pH2.6)で順次洗浄して、非結合抗体又は外来タンパク質を除去する。次いでカラムをリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中で平衡化し、PDIを含む細胞培養上清又は細胞抽出物をゆっくりとカラムに通す。該カラムをリン酸緩衝生理食塩水で光学密度(A₂₈₀)がバックグラウンドに低下するまで洗浄し、次いでタンパク質を0.23MグリシンHCl(pH2.6)で溶離する。次いで、精製PDIタンパク質をリン酸緩衝生理食塩水に対して透析する。

グする。

初回抗原刺激(priming)から約4日後、ブリストン感染Seib/マウスに、マウス当たり約0.5mlで、約2×10⁶〜約6×10⁶のハイブリドーマ細胞を注射することにより、モノクローナル抗体をin vivoで産生する。細胞のトランスファーから約8〜12日後に腹水を回収し、当業者に公知の方法でモノクローナル抗体を精製する。

約2%のウシ胎児血清を含むDMEM中でハイブリドーマを増殖させてin vitroのmAb産法を行い、十分な量の特異的mAbを得る。該mAbを当業者に公知の方法で精製する。

緩水又はハイブリドーマ培養液の抗体価を、種々の血液学的又は免疫学的アッセイ、例えば非限定的具体例として、沈降法、免疫凝集、ELISA(enzyme-linked immunosorbent antibody)及びラジオイムノアッセイ(RIA)で測定する。細胞のアッセイを用いて、体液又は細胞及び細胞抽出物中のPDIの存在を検出する。

当業者には容易に理解されるように、単一特異性抗体を

以下の実施例は本発明を説明するためのものであって、その範囲を限定するものではない。

実施例 1

株及び培養条件

Saccharomyces cerevisiae株 MD40/4C (MAT_a, leu2-3-112, ura2, his3-11, +16, trp1) 及び AS8324 (MAT_a/MAT⁺ his3/his3, leu2/leu2, ura3/ura3, trp1/trp1) を、YEPD (1%バクトペプトン、1%酵母抽出物、2%グルコース) 又は pH 6、8 緩衝最少培地 (0.67% アミノ酸結合有酵母營養ベース、2%グルコース、1%コハク酸、0.6% NaOH、50 μg/ml ノゾイノシトール) に必要な塩素及びアミノ酸を加えたもので 30°C で増殖させた。

S. cerevisiae 株 JRY188 (MAT_a, sur3-8, leu2-112, trp1, ura3-52, his4; Brake, A. J. 等, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81,

pp. 4842-4846) 及び B11995 (MATE, ieu2, trp1, ura3-82, prb1-1322, pep4-3, gal2; Jones, E. W., 1991, Methods Enzymol., 194, pp. 428-458) を PDI 過剰発現の経路に使用し、適当な実施例に記載のように増殖させた。

大腸菌 (Escherichia coli) 株 DH5 α (supE44 lacU169 (ϕ 8013 lacZ AM15) hsdR17 recA1 endA2 gyrA96 ihf1 relA1) をプラスミドスグウェアング操作に使用した。

実施例 2

DNA操作

制限ヌクレアーゼ消化及びDNA増幅を、酵素製造業者 (SCL, BRL) の指示に従って実施した。E. coli 形質転換の標準的プロトコル (Cohenら, 1972, P. N. A. S. U.S.A., 69, pp. 2110-9) 及び S. cerevisiae 形質転換の標準的プロトコル (Beggs, 1978, Nature, 275, pp.

6, 所出引用文献) を適用した。

非組込みヌクレオチドから標識オリゴヌクレオチドを分離すべく DE-52 クロマトグラフィーを使用して、前記ライブラリーをスクリーニングするために、前記オリゴヌクレオチド50ngを [γ - 32 P] dATP [Amersham, 3000Ci/mmole,] 及び T4ポリヌクレオチドキナーゼで末端標識した。次のようなコロニーハイブリダイゼーションにより、約20, 000 DH5 α 超換元コロニーをニトロセルロースフィルターでスクリーニングした: 各ニトロセルロースフィルターを、55gホルムアミド、6xSSC、1xデンハート溶液、250 μ g/ml変性サケ精子DNA、0.1%SDS中で、37℃で15時間におたり予備ハイブリダイズした。標識オリゴヌクレオチド (比活性4, 8x10⁷cpm/ μ g) を0.0℃で3分間変性し、次いで予備ハイブリダイゼーション緩衝液中で2ng/mlに希釈し、フィルターに加えた。37℃で更に16時間インキュベートした後、フィルターを除去し、4xSSC、0.1%SDS中で2分間洗った。該フィルターを一晩オートラジオグラフィーにかけた。

39個の潜在的陽性コロニーが同定され、これらを前送

104-9:1108, 1983, J. Bacteriol., 153, pp. 163-8) を実施した。Holmらの方針 (1983, Gene, 42, pp. 168-73) で S. cerevisiae からゲノムDNAを製造した。

実施例 3

PDI遺伝子の発現

高コピー数15U2-d、2ミクロンベクターpMA3 α (Crouzet及びTovite, 1987, 所出引用文献) の BamH1部位にクローニングした S. cerevisiae 株SKQ20 [α /s ade1/+ ade2/+ his1/+; G410n^r、所出引用文献] に由来するDNAの部分 Sau3Aフラグメントを含む酵母ゲノムライブラリーを、PDI遺伝子についてのスクリーニングに使用した。30マーオリゴヌクレオチド (5'-CTTACACTGACACACCAAGGACGTAGAA3') (配列番号: 5) を、商業に保存されている「オレドキシレン株」塩基部位 (PYAPWCGHCK) (配列番号: 4) に対して、塩し酵母コドンバイアスを用いて (Scarfa, 198

のスクリーニングに更に2回かけると、その後で10回の陽性クローン (標識付きC1~C10) が得られた。これらのクローンのうちの二つ (C7及びC10) の制限地図を作成し、クローンC7を後続の研究のために選択した。

実施例 4

DNA配列の解析

配列決定に適した大きさのフラグメントを同定するために、クローンC7を一連の制限酵素で消化し、1%アガロースゲル上でフラグメントを分離し、真空ブロッティング装置 (Nybaidd Ltd.) を用いて Gene Screen Plus プラシマ (Duropon) にトランスファーした。次いで、Maniatisらの方針 (1982, 所出引用文献) に実質的に対応してフィルターを予備ハイブリダイズし、その後、前述のように末端標識した30マーオリゴヌクレオチドプローブを加えた。ハイブリダイゼーションを6xSSC中43℃で24時間実施し、次いで2回の洗浄を200mlの2xSSC中室温で5分間行い、更に2回の洗浄を200mlの2xSSC、0.1%SDS中65℃で1時間行い、最後に500mlの0.

1×SSC中で室温で1回洗浄した。次いでフィルターを-70℃で45時間オートラジオグラフィーにかけた。

ジデオキシ核糖ヌクレオチド酸 (Sangerら, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 3463-67) を用いて、クローンC7に由来する2.4 kbのBaIII-HindIIIフラグメントを完全に配列決定した。配列決定に用いた前駆フラグメントを、Holmes及びQuigleyの迅速な方法 (1981, *Anal. Biochem.*, pp. 193-7) を用いて配列決定用に製造したプラスミドDNAとpUC19とにサブクローニングした。更に、幾つかのフラグメントを一本鎖ベクターmp12又はmp13にクローニングした (Messing, 1983, *Methods Enzymol.*, 101, pp. 20-78)。一連の配列決定プライマー (15~18マー) を合成した。これらのプライマーは、クローニングベクターのポリリンカー領域、又は予め決定した内部C7-DNA配列にアニーリングする。プライマーのアニーリングに先立ち、プラスミドDNAを0.2M NaOH、2mM EDTA中で37℃で30分間変性し、0.1当量の醋酸ナトリウ

ムPR5.0の溶液によって中和し、3当量の95%エタノールで-70℃で15分間沈降させた。[α -³²P] dATP (3000 Ci/mmol; ICN) を標識に使用して、in vitroの延伸を行うために、T7-DNAポリメラーゼ (Sequences, U.S. Biochemicals) を製造業者の指示通りに施用した。反応を既述されている方法で解析した (Sossiasら, 1989, *Gene*, 78, pp. 323-30)。

実施例 5

RNAの製法及び解析

株MD40/40の指数増殖細胞 (5×10⁶~1×10⁷細胞/ml) 又は定常相細胞 (2×10⁶細胞/ml) から完全RNAを製造した。30分間の熱衝撃 (30℃~42℃) にかけたMD40/40の指数増殖細胞からもRNAを抽出した。完全RNAは、本質的にRobersonの方法 (1983, *Nucleic Acids Res.*, 11, 2287-2302) に従って抽出した。

ノーザンブロット解析を次のように実施した: 20µgの完全RNAを20%ホルムアルデヒド、50%ギオン

ホルムアミド中で55℃で15分間加熱することにより変性し、次いで8%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル中で分離した。該RNAを異相ブロッティングでニトロセルロースフィルター (SSS, BA85) にトランスファーし、該フィルターを10mM トリス-HCl中で5分間煮沸した。ハイブリダイゼーションを、10×デンハート溶液、2×SSC、50mMリン酸緩衝液pH6.5、40%ホルムアミド、0.1%SDS、400µg/ml熱変性サケ精子DNA及び1~5ng/mlのプロンプ中で42℃で一晩実施した。フィルターを-70℃で1~5日間オートラジオグラフィーにかけた。使用したプローブは、PDI1遺伝子に由来する0.8 kbのHindIII-SmaIフラグメント (Parquhar, R.ら, 前出引用文献、第2図参照)、並びにpBR322にクローニングしたS. cerevisiaeの18S及び26SリボソームRNA遺伝子の一部分を含むプラスミドpCp7 (Dr. B. S. Cross, University of Oxford) から入手) である。これらのプローブは、ランダムプライマー合成 (BCI) で製造業者の指示に従って標識した。

実施例 6

pdi1: HIS3対立遺伝子の選別

HIS3遺伝子を有する1.8 kbのBamHIフラグメントをプラスミドpMA700から放出させ (Montielら, 1984, 前出引用文献)、1%低融点アガロース (Sigma) 上で精製した。該フラグメントのBamHI待望末端を、Mannatisらの方 (1982, 前出引用文献) で、dNTPsとDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントとを用いて充填した。次いでPDI1遺伝子の1.2 kb EcoRI-BglIIIフラグメントを、プラスミドpUC19のポリリンカー内のSmaI-BamHI部位にサブクローニングした。最後に、HIS3遺伝子を含む完結したBamHIフラグメントを、PDI1コーディング領域内の単一のEcoRV部位に連結した (第3図)。得られたpdi1: HIS3対立遺伝子を3.0 kbのSmaI-EcoRIフラグメント上に選別させ、低融点アガロース上で精製し、1100の酢酸サリチル酸型転換プロトコル (1983, 前出引用文献) を用いて二倍体株AS3324をHis⁺プロトタイプ

(property) に影響を及ぼすのに使用した。

実施例 7

in vitro の PDI アッセイ

全タンパク質抽出物における PDI 活性のアッセイを、Hill 等の方法 (1984, Methods Enzymol., 107, pp. 281-92) で実施した。

試薬の調製

スクランブルリボヌクレアーゼ (scrambled ribonuclease) は、ランダムに形成されたジスルフィド結合を含む完全に酸化した混合物である。これは、市販の (Sigma) ワン細胞リボヌクレアーゼ A から下記の方法で調製する。

リボヌクレアーゼを、50 mM トリス-HCl 緩衝液、pH 8.6、8.9 M 尿素、100 mM ジチオトレイトール (還元可能ジスルフィド結合に対して約 1.5 倍モル過剰なジチオトレイトール) 中 80 mg/ml (約 2.2 mM) で、室温で 18 時間〜20 時間、又は 55℃ で 1 時間イン

kubade x G-25 から遊離することにより、スクランブル混合物を回収する。タンパク質含有フラクションをブールし、1 M トリスで pH 8 に調整し、4℃ で貯蔵する。

この方法によるスクランブルリボヌクレアーゼの収率は通常 90〜100% である。該混合物は溶液中 4℃ で 6 ヶ月まで安定であり、あるいは、50 mM NH₄・HCO₃、pH 7.8 中に透析し、凍いで凍結乾燥して、-20℃ で無病菌に貯蔵し得る白色結晶状固体物質としてもよい。

アッセイの手順

試薬、スクランブルリボヌクレアーゼは、約 2% の天然リボヌクレアーゼ活性を有する高分子量 RNA の加水分解開裂では本質的に不活性である。スクランブルリボヌクレアーゼ中の分子間及び分子内ジスルフィドの交換の阻害における PDI の作用は、天然ジスルフィド結合、天然配座を回復させ、RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を随時的に回復させる (concomitant reformation)。このようにして、PDI の活性を、迅速中にアリコートが採取されるタイムコース (time-course) インキュベーションによってアッセイし、RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を測定する。

反応混合物を水相酸で pH 4 に酸性化し、その直後に、蒸ガスした 0.1 M 酢酸で Sephadex G-25 から遊離することにより、還元タンパク質を分離する。280 nm で溶解フラクションをモニターし、タンパク質含有フラクションをブールし、天然リボヌクレアーゼを標識として用いて、タンパク質濃度を分光光学的に又は化学的に測定する。

還元リボヌクレアーゼの試料を 0.1 M 酢酸で約 0.5 mg/ml に希釈する。固液尿素を最終濃度 10 M まで加え、塩酸サルコシンを 0.1 M まで加える (サルコシンは濃厚尿素溶液中に存在するシアネートイオンと反応させるために加えられ、カルピル化によってリボヌクレアーゼを不活性化し得る)。1 M トリスで pH を 8.5 に調整し、等所室温で 2〜3 日間インキュベートする。その間にタンパク質は大概 0₂ によってランダムに再酸化される。このインキュベーションの後で、5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を用いて遊離チオール基を調べると、再酸化が完了していることが判明する (リボヌクレアーゼ分当あたり 0.1 以下の遊離チオール)。

水相酸で pH 4 に酸性化し、0.1 M 酢酸中で Sep

タンパク質ジスルフィドイソメラーゼの試料を、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.5 に、最終量が 900 μl になるまで加え、10⁻⁶M ジチオトレイトール (10 μl の 1 mM ストック溶液、毎日新しく調製) と共に 30℃ で 2〜3 時間等温インキュベートする。トリス-HCl 緩衝液も使用し得るが、その場合は活性が約 25% 低下する。次いでアッセイを、スクランブルリボヌクレアーゼの 100 μl アリコート (10 mM 酢酸中 0.5 mg/ml ストック溶液、毎日新しく調製) の添加により開始し、インキュベーション混合物を 30℃ に維持する。より小さい規模で操作する場合は、前述の量を 1/10 に減少して、最終アッセイ量を 100 μl とし得る。10 μl アリコートを 0.5 分の時点で採取し、その後 2〜3 分間隔で 18 分まで採取して、スクランブルリボヌクレアーゼの再活性化についてアッセイする。各アリコートは、30℃ で予め平衡化した石英インキュベーター内で、0.25 mg の高濃度に重合した酵母 RNA (30 μl の 5 mg/ml ストック溶液) を含む 3 ml の 75 mM 酢酸 (50 mM トリス-HCl 緩衝液、pH 7.5、25 mM KCl、5 mM MgCl₂) のアッセイ混合物に即座に加える。Perk

ion-B time 3.56分先読後読(バンド幅2.5nm)のデュアル検出モードを用いてリボヌクレアーゼ活性を30℃でモニターし、 A_{240} (ΔA)に対する A_{260} の変化を測定する。RNA加水分解速度(ΔA 分 $^{-1}$)は1.5〜2分におおって一定である。この速度に応じてインキュベーションからのアリコートの採取時間をプロットしたグラフは、1.5分まで直線である。時間座移(time course)の線直線部分の勾配(ΔA 分 $^{-1}$ 分 $^{-1}$)を三つ組みアッセイの線形回帰分析で計算し(相関係数は決まっておき0.99である)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性の測定値とする。

シチオトシトールのみによるスクランブルリボヌクレアーゼの非酵素的再活性化の速度を測定するために、酵素試料を省略して対照インキュベーションを実施する。これらの速度は通常 $0.2 \times 10^{-1} \Delta A$ 分 $^{-1}$ 分 $^{-1}$ であり、酵素試料のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性の計算で差し引かれる。

1単位のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性は、1リボヌクレアーゼ単位/分の速度でスクランブルリボヌクレアーゼの再活性化を触媒する量であると定義される。

実施例 8

酵母LYS2又はURA3座にpU19複製カセットを増殖するためのベクターの構築

LYS2での組み込みのためのベクターを下記の手順で構築した。プラスミドpUC19をHindIIIで消化し、線形ベクターフラグメントをゲル精製した。次いでこのフラグメントをEcoRIで消化し、得られた2.7kbpのEcoRI-HindIIIベクターフラグメントをゲル精製した。該精製フラグメントを下記の合成オリゴヌクレオチドと連結した:

5'-ATTCGCGCCGCAGCTTGCCGCCGC-3' (配列番号:6)

3'-CGCCGCGGTTCCAGCGCGCGTCCGA-5' (配列番号:7)

該オリゴヌクレオチドは、EcoRI付着末端と、NotI部位と、HindIII部位と、NotI部位と、HindIII付着末端とをこの順序で含む。得られたプラスミドpUC-NotIは、両端でNotI部位に直接フランキングされた単一のHindIII部位を含む。

URA3座に組み込むべき複製カセットのターゲッティングのためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母URA3遺伝子座は、YEp10に由来する1.1kbpのH

1リボヌクレアーゼ単位は、1吸収(adsorbance)単位/分の A_{240} に対する A_{260} の変化を生成する量であると定義される。

incI Iフラグメントであった[Parsent, S. A.ら, 1988, Yeast, 1, pp. 83-188]。プラスミドpUC-NotIをHindIIIで消化し、子ウシ腸アルカリホスファターゼで脱リン酸化し、1.1kbpのHindIII-URA3フラグメントと連結して、プラスミドpUC-NotI-URA3を得た。

LYS2座への複製カセットの組み込みをターゲッティングするためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母LYS2遺伝子座を有するプラスミドYIp600 [Barnes, D. A. 及びThompson, J., 1986, Mol. Cell. Biol., 6, pp. 2828-2838]をEcoRI及びHindIIIで消化し、LYS2遺伝子座を有する4.5kbpのEcoRI-HindIIIフラグメントを、予めEcoRI及びHindIIIで消化したpUC19にクローニングした。次いでこのプラスミドをPvuII及びBglIIで消化し、LYS2遺伝子座を有する3.7kbpのPvuII-BglIIフラグメントをゲル精製し、平末端消化した。プラスミドpUC-NotIをHindIIIで消化し、子ウシ腸アルカリホスファターゼで脱リン酸化し、平末端消化し、3.7

kbpのLYS 2フラグメントと連結した。所期の構造を有する得られたプラスミドをpUC-N^ot-LYS 2 (pNLとも称する)で消化した。

LYS 2での組込みのための第二のベクターも構築した。プラスミドY1p600をNcoIで消化し、LYS 2クランピングコーディング配列の大部分を含む3.0kbpのNcoIフラグメントをゲル精製し、平滑化(smoother)末端化した。プラスミドpUC13をBamHIで消化し、平滑末端化し、3.0kbpのLYS 2フラグメントと連結して、組込みベクターpUC13-LYS 2を得た。

実施例 9

酵母アルファ因子分泌リーダーに融合したヒトPDIを発現させる酵母株の構築

ヒトPDIコーディング配列源は、Pihlajaniemiら(1987、前出引用文献)によって記載されている複製部分的cDNAクローン、p210及びp1であった。ヒトPDI cDNAの5'末端を有するp210に由来する約4.5kbpのEcoR1-PstIフラグメントをpUC13にクローニングして、プラスミドpUK

消化した。その結果得られた、成熟ヒトPDIコーディング配列を有する1.9kbpのHindIII-HindIIIフラグメントをゲル精製し、予めSacI及びHindIIIで消化したプラスミドpGS4にサブクローニングした(pGS4はアルファ融合因子(第1)ブレブロー分泌リーダー配列に融合した酵母GAL1プロモーターを有する；Shaw, K. J. ら, 1988, DNA, 117-126)。平滑末端化SacI及びHindIII末端の間に形成された融合部は、MDA1ブレブロー分泌配列とヒトPDI成熟部分との間の正確なインフレーム融合を再構築する(得られたプラスミドはpUKC161と命名した(第4図))。

LYS 2組込みベクターpNL(pUC-N^ot-LYS 2)をSacI及びXhoIで消化し、T4 DNAポリメラーゼでの処理によって平滑末端化した。プラスミドpUKC161をEcoR1及びHindIIIで消化し、その結果得られた、GAL10プロモーター-アルファ因子ブレブロー分泌-ヒトPDI発現カセットを有する2.8kbpのEcoR1-HindIIIフラグメントをゲル精製し、T4 DNAポリメラーゼでの処理

C150を得た。次いで該プラスミドpUKC150をEcoR1及びXhoIで消化した(XhoIは成熟ヒトPDIをコードする配列の第三のアミノ酸に対応する位置で切断する)。得られた3.1kbpのベクター重鎖(bacterial clone)フラグメントをゲル精製し、下記の構造のオリゴヌクレオチドアダプターと連結した：

5'-AAATCGTTGACGCC-3' (配列番号：8)

3'-GCAACTGCGGGGCT-5' (配列番号：9)

該アダプターは成熟PDIコーディング配列の5'末端を再構築し、所望の分泌リーダー配列への成熟ヒトPDI配列の正確な融合を可能にするような位置にHindIII部位を含む。

次いで、得られたプラスミドpUKC159をPstIで消化し、子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理し、ヒトPDIコーディング配列の残部を有するプラスミドpI (Pihlajaniemiら, 1987、前出参考文献)に由来する1.5kbpのPstI-PstIフラグメントに連結して、プラスミドpUKC160を得た。このプラスミドpUKC160をHindIII(前記オリゴアダプター内で切断する)で消化し、次いでHindIIIで

によって平滑末端化した。前記平滑末端化pNLベクターフラグメントと該発現カセットフラグメントとを互いに連結し、該連結混合物を用いてE. coli株ATCC 8539Iを形質転換した。所期の構造を有するプラスミドを含むものについて形質転換体をスクリーニングし、得られたプラスミドpNL-MDA1-hPDIを多量に製造した。pNL-MDA1-hPDIをNcoIで消化すると、両側でLYS 2 DNA配列にフランキングされた、2kbpの発現カセットが得られる。消化したDNAを用いて、スフエロプラスト法で(Hinnen A. ら, 1978, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 75, pp. 1929-1933)、S. cerevisiae株B1995及びERY188を形質転換した。NcoI末端はターゲッティングデバイスとして作用しながら発現カセットを染色体LYS 2座に同化させ、該座で前記カセットが相同交換を介して組込まれた。形質転換体を、アルファアミノアジピン酸発現阻害剤で増殖するものについてスクリーニングした(Chattop, B. B. G., 1976, Genetics, 91, pp. 51; Barnes及びThornar, 1986, 前出

参考文献) , このような増殖は、挿入が 1.5 kb であることを意味する。LYS 2 プローブを用いて行ったクローン単離体のサザンブロット分析で、発現カセットが LYS 2 座に組み込まれたことが確認された。Fig. 1 I で消化した染色体 DNA 四聯体は、LYS 2 プローブとハイブリダイズするバンドについて、5' から 3'、8 kb への所定のサイズ変化を示した。その結果得られた、組み込み発現カセットを含む BJ 1995 及び JRY 188 関連株を、それぞれ BJ 1995 / アルファ - hPD1 及び JRY 188 / アルファ - hPD1 (株 # 1D72A) と命名した。

天 数 例 1 0

字母 P D I 又はヒト P O I シグナル配列を用いるヒト P D
I を過剰発現する酵母株の構築

PDI cDNA クローン p1 (Pis1.1a.janie
m.1987, 船岡引用文献) を PstI で消化し、
ヒト PDI cDNA の 3' 領域を有する i. S. kbp の
PstI - PstI フラグメントをゲル精製した。次いで
該フラグメントを pURC150 (前記実験例 9 に記載)
の XbaI 1 部位に挿入してプラスミド pURC155 を得

製した。

pUC19をBamHI及びBamHIで消化し、2.7 kbのpのベクターフラグメントをゲル精製した。下記のオリゴヌクレオチドを合成した：

1. 5'-GATCGCAGAAAACAAATGCTGCGCCGGGCTCTGCTTGTGCTTCCCTGGTG
TCCGCGCTGTGCTGGCGCGGACGCGCC-3'
(オリゴ # 13165-220)
(配列番号 : 10)
2. 5'-TGGGCGCGGTCCGCGCGCACCAGGCGCGGACCGGCGAGGCACAGCAG
AGCGCGCGCGACGCAITTTGTTTTGTG-3'
(オリゴ # 13165-221)
(配列番号 : 11)
3. 5'-GATCGCAGAAAACAAATGAGATTTTCTGCTGCGTCCGCTCCGTCATGG
TCCCTGCTGTGCTCTGCGCTGCTCTGTTTTCCGCGACGCGCC-3'
(オリゴ # 13165-249)
(配列番号 : 12)
4. 5'-TCCGCGCGCTCTCGCGAAAACAGAGGAGCGGACGACGCGGAGGAGCT
GACAGGACCGGACCGACGCAAAACCTTCATTTTGTGTTTGTG-3'
(オリゴ # 13165-259)
(配列番号 : 13)

3. 該プラスミドは、完全な全長ヒトPDI cDNAを含んでいる。該pUKC153をHindIIIで消化し、適当なオリゴヌクレオチドアダプター（EcoRI認識配列を含む）と連結して、PDI cDNAの3'末端に位置するHindIII部位をEcoRI部位に変換した。得られたプラスミドpUKC153は、2.1kbpのEcoRIフラグメント上の完全ヒトPDIコーディング配列を含んでいる。該プラスミドpUKC153をEcoRI及びPstIで消化した。その結果得られた、ヒトPDI配列の5'部分及び3'部分をそれぞれ有する0.47kbpのEcoRI-PstIフラグメント及び1.7kbpのPstI-EcoRIフラグメントをゲル精製した。pUC19をEcoRI及びPstIで消化し、2.7kbpのベクターフラグメントをゲル精製し、次いで前述の0.47kbpのEcoRI-PstIフラグメントに連結した。感受性細胞を用いてE. coli ATCC 35691を形質転換した。原形の構造を有するプラスミドを含む影響転換体からプラスミドDNAを製造した。該DNAをAvaI及びPstIで消化し、ヒトPDI配列の5'部分を有する0.38kbpフラグメントをゲル精

オリゴヌクレオチド#15165-220及び15165-240をキナーゼ処理し、次いでそれぞれオリゴヌクレオチド#15165-221及び15165-250とアニーリングした。ヒトPDIシグナルペプチド配列を有するヒトPDIを再構築するために、下記の連結を行った: pUC19 2.7kb p BamHI-EcoR I フラグメントを1.7kb p PstI-EcoR I hPDIシグナルペプチド、0.3kb p PstI-AvuI 5'-hPDIフラグメント、並びにアニーリングしたリンカー-15165-220及び15165-221を連結した。

酵母 P D I シグナル配列を有するヒト P D I を再構築す
 るために、下記の連結混合物を形成した：pUC19 (2.1
 7 k b p, BamH I - EcoR I フラグメントを 1, 7
 k b p, PstI - EcoR I h P D I 3' フラグメン
 ト、0.38 k b p PstI - AvaI 8' - h P D
 I フラグメント、並びにアニーリングしたリンカー - 151
 65 - 249 及び 15165 - 280 と連結した。(アニ
 ーリングしたリンカーは BamH I 及び AvaI 付着末端
 を含み、指示されたシグナルペプチド配列及び酵母 5' 非

メントが逆置な方向で挿入されたプラスミドpUC-ySP-hPDI (HDBL) 及びpUC-hSP-hPDI (HDBL) を得た。これら二つのプラスミドをBamHIで消化し、発現カセットを有する二つの異なる1.5 kbのBamHIフラグメントをゲル精製し、次いでp401のBamHI部位に挿入して、それぞれpUC-GAL10p-ySP-hPDI (HDBL) 及びpUC-GAL10p-hSP-hPDI (HDBL) を得た。これら二つのプラスミドをSmaI、SphI及びPvuIで消化した。得られた二つの2.5 kbのSmaI-SphIフラグメントをゲル精製し、平末端端化し、次いで、予めXhoIで消化しておいたpUC13-LYS2と連結し、平末端端化した。得られた二つのプラスミドpLYS2-ySP-hPDI (HDBL) 及びpLYS2-hSP-hPDI (HDBL) をHpaI及びEcoRVでの消化によって線形化し、次いで制限の反応で株J1995及びJRY188の形質転換に使用した。LYS2形質転換体を、アルファアミノアジピン酸含有細胞媒体上で選択した。LYS2座に組み込んだ両置の発現カセットを含む細胞を、ゲノムDNAのサザンブロット分析によって

EcoRIフラグメントの両方と連結してプラスミドpUC-MFα1-hPDI (HDBL) を得た。該プラスミドをBamHIで消化し、PDIカセットを有する1.7 kbのBamHI-BamHIフラグメントをゲル精製し、プラスミドp401 (第6図) のBamHI部位に挿入して、プラスミドpGAL-MFα1-hPDI (HDBL) を得た。次いで該プラスミドをSmaI、SphI及びPvuIで消化し、その結果得られた、発現カセットを有する2.6 kbのSmaI-SphIフラグメントをゲル精製し、平末端端化した。pUC13-LYS2ベクターをXhoIで消化し、平末端端化し、次いで前述の2.6 kbの平末端端化フラグメントに連結した。得られたプラスミドpLYS2-MFα1-hPDI (HDBL) をHpaI及びEcoRVで消化し、次いで株JRY188及びJ1995の形質転換に使用した。得られた形質転換体を (実施例9に記載のように) ゲノムDNAのサザンブロットで評価し、所望の発現カセットがLYS2座に組み込まれていることを確認した。JRY188形質転換体を株#1279と命名した。

実施例 13

同定した。得られた株を、J1995/ySP-hPDI (HDBL)、J1995/hSP-hPDI (HDBL)、JRY188/ySP-hPDI (HDBL) (株#1268) 及びJRY188/hSP-hPDI (HDBL) (株#1267) と命名した。

実施例 12

酵母アルファ因子分泌リーダーを用いるヒトPDIのC末端HDBL突然変異体を発現産出する酵母株の構築

プラスミドpUK161 (第4図) をBamHI及びCiaIで消化し、アルファ因子プロセグリーダー配列とhPDIの5'-セグメントとを有する0.7 kbのBamHI-CiaIフラグメントをゲル精製した。プラスミドpUC-ySP-hPDI (HDBL) (実施例11に記載) をCiaI及びEcoRIで消化し、C末端HDBL改変を有するhPDIの3'セグメントを含む1.0 kbのCiaI-EcoRIフラグメントをゲル精製した。pUC19をBamHI及びEcoRIで消化し、得られたベクターフラグメントを、0.7 kbのBamHI-CiaIフラグメント及び1.0 kbのCiaI-

LYS2座の組み込み発現カセットから酵母PDIタンパク質を発現産出する酵母株の構築

完全酵母PDI1遺伝子を有するプラスミドC7 (実施例4に記載) をEcoRVで消化し、酵母PDI核取り枠(ORF)のC末端部分(アミノ酸223からORFの末端まで)と3'非翻訳配列とを含む1.8 kbのEcoRV-EcoRVフラグメントをゲル精製し、プラスミドpAT153 (Twigg, A. G. 及びSheratt, D., 1980, Nature, 283, pp. 216-218) のEcoRV部位に挿入して、pUK169を得た。次いでプラスミドC7をBamI及びEcoRVで消化し、酵母PDI ORFのアミノ酸8~222をコードする0.67 kbのBamI-EcoRVフラグメントをゲル精製し、下記の合成オリゴヌクレオチドアダプターと連結した:

5'-GATCCAGAACAAATGGAGTTTCTGCTG-3' (配列番号:16)

3'-GTGTTTGTGTTTCTCTCAAGAGGACACG-5' (配列番号:17)

該オリゴヌクレオチドアダプターはそれぞれBamHI及びBamI付着末端を有し、酵母PDI ORFのアミノ酸1~8と12塩基対の酵母5'非翻訳リーダー配列とを

コードする。(A T G開始コドン以下線で示されている)。得られた0.7 kbpの Bam H I - Eco R Vフラグメントをゲル精製し、次いで、予め Eco R V及び Bam H Iで消化しておいたp A T 153にサブクローニングして、プラスミドp U K C 170を得た。

プラスミドp U K C 158を Eco R Vで消化し、その結果得られた、酵母P D Iの前記C末端部分を有する1.3 kbpの Eco R V - Eco R Vフラグメントをゲル精製し、次いでp U K C 170の終反復 Eco R V部位に挿入し、それによって無傷の(完全な)酵母P D I (y P D I) 遺伝子を再産した。このようにして得たプラスミドをp U K C 175と命名した。

p U K C 175を Eco N Iで消化し、y P D I遺伝子を有する得られた2.1 kbpフラグメントを平滑末端化し、ゲル精製した。p U C 19を Sac I及び Sma Iで消化し、平滑末端化し、前記平滑末端化 Eco N I - y P D Iフラグメントと連結した。放線菌融合物を用いて E. coli DH5細胞を形質転換し、得られた形質転換体を、p U C 18ポリリンカー内の Bam H I部位がy P D Iコーディング配列の5'末端に隣接して配置されるよう

に適切な方向でy P D I挿入体を有するプラスミドを含むものについてスクリーニングした。 Eco N Iフラグメント上のy P D I - O R Fの5'末端には Bam H I部位が既に存在していたため、成績藥物(p U C 19-y P D Iと命名)はこの時点で、1.9 kbpの Bam H Iフラグメント上にy P D I - O R Fを含む。p U C 19-y P D Iを Bam H Iで消化し、y P D I遺伝子を有する1.9

Bam H I - kbpフラグメントをゲル精製し、次いでベクターp U C 18-G A L 10 p (B) A D H 1 t (ストック#401) (第6図)の Bam H I部位にサブクローニングした。得られたプラスミドp U C 18-G A L 10 p-y P D I-A D H 1 t (例7図)はストック#1015である。プラスミドp U C 18-G A L 10 p-y P D I-A D H 1 tを Sma I、Sph I及び Sac Iで消化し、発現カセットを有する2.7 kbpの Sma I - Sph Iフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、次いでp U K C 171 (p U K C 171は、予め Eco K I及び Hind I I Iで消化しておいたp U C 19にサブクローニングしたY 1 p 600 (B a r n e s 及びT h o r n e r, 1986, 前出引用文献)の4.5 k Eco R I -

Hind I I I - LYS 2フラグメントを含む)の終反復 Sma I部位にクローニングした。得られたp U K C 171-G A L 10 p-y P D Iベクターを Eco R I及び Pvu I Iで消化して LYS 2-G A L 10 p-y P D I-A D H 1 t - LYS 2カセットを切除し、これを用いて S. cerevisiae株R Y 188及びR Y 199を形質転換した。得られた lys⁺形質転換体を、実施例9に記載のように、ゲノムDNA構築物のサザンブロットにより評価した。 LYS 2座に組み込まれたG A L 10 p-y P D Iカセットを有する各株の単離株が検出された。得られた株をR Y 199/y P D I及びR Y 198/y P D I (株#1152)と命名した。

実施例 14

URA 3座への組み込まれたカセットから酵母P D Iを過剰産出する酵母株の構築

プラスミドp U C -N o t I -U R A 3 (実施例8)を Pst I及び Nco Iで消化し(URA 3遺伝子の一部分を欠失させるため)、平滑末端化した。プラスミドp U C 18-G A L 10 p-y P D I-A D H 1 tを Eco R I、

Sac I及び Sph Iで消化し、G A L 10 p-y P D I-A D H 1 t発現カセットを有する2.8 kbpの Eco R I - Sph Iフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、前記ベクターフラグメントと連結して、プラスミドp N U -G A L 10 p-y P D Iを得た。N o t Iでの消化により、p N U -G A L 10 p-y P D IからU R A 3-G A L 10 p-y P D I-A D H 1 t-U R A 3組込みカセットを切り出した。得られた線形フラグメントを用いて酵母株K H Y 107を形質転換した。5-フルオロ-オキソ酸含有固体培地上で(B o e k e r, 1984, M o l. G e n. G e n e t., 197, pp. 345), ura⁻形質転換体を選抜した。得られた ura⁻形質転換体から得るゲノムDNAを Eg 1 I Iで消化し、G A L 10 p-y P D I-A D H 1 tカセット由来の放射法標識した Eco R I - Pvu I I Iフラグメントをプローブとして用いて、サザンブロットにより評価した。所望のG A L 10 p-y P D I-A D H 1 t発現カセットを URA 3に組み込んだ単離株が同定された。単離株K-Y1は、URA 3に組み込まれた複製のコピーを有していた(株#1138)。単離株K-Y3は、URA 3に組み込まれたコピーを一つだけ

有していた（株#1137）。

実施例 15

組織培養液内のPDIタンパク質量の評価

酵母株を、3×YEPD液体培地で、23℃で24時間増殖させた。24時間が経過した後、培養物にガラクトースを最終濃度4、8%まで加えた。次いで培養物を23℃で更に24時間再インキュベートした。あるいは、酵母株を3×YEPDで30℃で24時間培養した。細胞を回収し、無菌冷水で洗浄し、同量の3×YEPD-ガラクトース培地に再懸濁させた。酵母細胞を更に16〜25時間インキュベートし、その後回収し、タンパク質を抽出方法2（下記）で抽出した。

タンパク質の抽出：

本質的にMelioraの方法（1983, Gene, 24, pp. 1〜14）に従い、ガラスビーズ破壊法を用いて、指数増殖細胞又は定常期細胞からタンパク質を抽出した。

方法1：25mMリン酸緩衝液pH7、0%のPMSE（0、5mM）の存在下で細胞壁のガラスビーズ破壊を

クリルアミドゲル及びレーン当たり10μgのローディングされたタンパク質（タンパク質抽出方法1）。後のゲル中でSigma予備染色分子重量標準を使用した。ゲルはBioRad mini-Protex 11ゲルスラムで操作した。タンパク質濃度を計算せずに、細胞外抽出物をレーン当たり15〜20μlでローディングした。電気泳動の間中、電圧は200ボルト以下に維持した。

Bio-metra毒蛇標ウエスタンブロットシステムを用いて、タンパク質をニトロセルロースに転写した。ニトロセルロース膜を5%（w/v）粉乳で1時間ブロックし、洗浄し、1：500〜1：750の希釈度で8時間から一晩にわたり、抗ヒトPDIポリクローナル抗体と共にインキュベートした。膜を洗浄し、ペルオキシダーゼ結合抗ウエッジ5Gを最終希釈度1：100で加え、インキュベーションを1時間続けた。洗浄後、Amersham ECLキットを製造業者の指示通りに使用して、ブロットを露出した。

最初のアッセイでは、株1072Aが分泌するPDIをウエスタンブロットで検出できるレベルで産生することが明らかになった。使用したECLプロトコルでは、検出レベルは0、

行い、次いで凍結-融解サイクルにかけてタンパク質を抽出し、13、000rpmで10分間の遠心分離により可溶性タンパク質を回収した。PEG（固体）、硫酸アンモニウム（0〜80%）又は限外濾過膜（<100kDa）での凍結の前又は後で、高濃度液の分画により最初に分画を分画した。タンパク質濃度はBradfordの方法（1976, Anal. Biochem., 72, pp. 248〜254）で測定した。

方法2：方法1に従って、但し培養培地にNaOH及びターメルカプトエタノールを（それぞれ最終濃度0、2M及び1%で）加え、氷上に約10分間放置し、その後TCAを最終濃度8%で加えて、細胞内試料を調製した。氷上で30分間静置した後、遠心分離によってタンパク質を回収し、冷アセトンで洗浄し、SDS-PAGEローディング緩衝液に再懸濁させた。

50μgの全可溶性タンパク質を、本質的にSchuilezの方法（1987, Gene, 54, pp. 113〜123）に従って、一次元SDS-PAGE（12%ポリアクリルアミド）とターマシブルー染色とで分析した。

次の条件で電気泳動を実施した：10%SDS-ポリア

05μgの精製ワシPDIであった。この分泌PDIは、100kDaカットオフ限外濾過膜によって保持されたため、二量体であることが判明した。株1072Aと対応するHDB1変異株（1279）とを比較すると、ヒトPDIは両方から分泌されていた。この実験では、最終培養/誘導条件を、増殖温度（℃）及び誘導期間について最適化した。所記二つの株は、23℃で培養し次いで30℃で16時間誘導するか、又は30℃で18時間培養し誘導すると、より高いPDI分泌レベルを示した。

実施例 16

酵母内でアンチスタチンを発現させるためのベクターの構築

アンチスタチンは血液凝固因子Xaの強力なタンパク質阻害物質である。アンチスタチン（ATS）は、メキシコヒルHaementeria officinalisの唾液腺から単離された（Mull, B., 1988, J. Biol. Chem., 263, pp. 10102〜10107）。その後、ATSをコードするcDNAがHan, J. H. により単離され、特徴が解明された（1989,

(配列番号: 19)

Gene, 75, pp. 47-57)。ATSは、細胞内
酵素によって分泌された異種タンパク質中の折り畳み及び
最適なジスルフィド結合の形成に対する高レベルのPDI
活性の影響を評価する上で重要なリポータータンパク質
である。なぜならATSは、タンパク質が生物学的活性を
有するようにするために正確な対を形成しなければならない
10個のジスルフィド結合を有するからである。

発現ベクターpKH4α2 (Jacobson, M, A,
ら, 1989, Gene, 85, pp. 511-516)
を用いて、酵母内でATSを発現させた。前記ベクターは、
ガラクトース誘導性GAL10プロモーターと、異種タン
パク質の分泌を利用するための酵母Mα1プロセソ分岐
リーダー配列を含む。ATSをコードする配列は、クロ
ンアセンシー (Horn, J. H, ら, 前出引用文献) に
由来するサブクローニングしたATS cDNAを基質と
して使用し且つ下記のオリゴヌクレオチドプライマーを用
いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法で単離した。

1. 5'-ATATGCGATGCTGTCCTTGGATAAAAGACAAGGACGATTGGAG
CCGCGTGT-3' (配列番号: 18)
2. 5'-TATAGGATGCTTATGCTTATGCGTGGGATTAAGCTT-3'

これらのプライマーは両方とも、PCR産物のサブクロー
ニングを容易にするためにBamHI部位を含む。第一の
プライマーは、酵母KEX2 yscFニンドプロテアー
ゼ開裂部位(Lys-Arg)N末端を、成熟ATSの熟
アミノ酸残基に挿入する(酵母yscFニンドプロテア
ーゼは該配列中のLys-Arg部位のC末端側で開裂す
る)。PCR産物をBamHIで消化し、ゲル精製し、次
いでBamHI消化pKH4α2に連結して、pKH4α
2/ATS (K991) (第8図)を得た。次いでこの発
現ベクターを用いて、スフェロプラスト法(Hinnen
ら, 1978, 前出引用文献)で、表1に示す酵母宿主株
を形質転換した。

ロイシンを含まない合成固体培地(Schultz, L.
ら, 1987: Gene, 61, pp. 123-183)
上で形質転換株を選択し、クローン単離株についてストリ
ークし、これらの単離株を遺伝的分析で使用した。株は、
1%グリセロール含有合成培地中で-70℃で貯蔵する
ことにより保存した。

表1

形質転換株	宿主株	元の株	PDI ⁺ カセット
990	239	JRY188	なし
1105	1072A	JRY188	アルファ-hPDI
1176	1157	JRY188	ySP-hPDI
1275	1148	JRY188	hSP-hPDI
1293	1279	JRY188	alpha-hPDI (HDEL)
1294	1267	JRY188	hSP-hPDI (HDEL)
1295	1268	JRY188	ySP-hPDI (HDEL)
1177	1252	JRY188	yPDI
1156	948	KRY107	なし
1254	1136	KRY107	yPDI-A1
1255	1137	KRY107	yPDI-A3

+ PDIカセット及び株は次のように実施例に記載され
ている: アルファ-hPDI、実施例9: ySP-hPDI
及びhSP-hPDI、実施例10: hSP-hPDI
(HDEL)及びySP-hPDI (HDEL)、実施例
11: アルファ-hPDI (HDEL)、実施例12: y
PDI、実施例13: yPDI-A1及びyPDI-A3、
実施例14。

* 形質転換株はK991アンチスタシリン発現ベクター
を含む。

実施例 17

アンチスタシリンの分泌に関する細胞及びPDI過剰産出株 の増殖及び評価

K991形質転換株JRY188株と、酵母もしくはヒ
トPDIを過剰産出する種々の形質転換株とを、下記
の方法でアンチスタシリンの分泌に関して評価した。指示さ
れた株を-70℃冷凍グリセロールストックからロイシン
無含有合成寒天プレート上にストリークし、30℃で3日
間増殖させた。5mlの3xYEH D [60g/L Difco
酵母抽出物、30g/L Hysopaペプトン、48gグル
コース/l]培地を入れた培養管(18x150mm)に
小ループサイズの細胞を接種し、細胞培養ロータードラム上
で28℃で約18時間インキュベートした。この段階で、
ガラクトースを最終濃度4.8% (w/v)で加えて細胞
を誘導し、培養物を23℃で更に5日間インキュベートし
た。次いで、遠心分離で細胞を回収し、清澄化培地上清を
アンチスタシリン活性のアッセイのために保持し、誘導性を
因子Xα活性の影響によって測定した【Naito, S, ら,
1989, 前出引用文献】。前実験は三つ組で実施した。
結果を要約して表2に示す。

表2

株	log A T S / 1. 9 0 D	相対レベル
JRY188	23.6	1.0
JRY188/hSP-hPDI	24.4	0.95
JRY188/ySP-hPDI	28.4	1.11
JRY188/alpha-hPDI	27.2	0.9
JRY188/yPDI	65.1	2.54

実施例 18

JRY188及びHDBL突然変異株ヒトPDIを過剰産生する菌落株によるアンチステリン分泌の評価

K991形質転換JRY188と、三つの異なる分泌リーダーを有するHDBL突然変異株ヒトPDIを過剰産生する形質転換菌落株とを実施例17に記載のように増殖し、清澄化培地を、実施例17に記載のように因子Xa阻害アッセイで分泌A T Sレベルについて評価した。結果は表3に示す。

表4

株	ATS(mg/L)	A600	ATS/A600
KRY107 A1	0.314	23.9	0.013
KRY107 A2	0.244	24.5	0.010
KRY107 A3	0.334	25.6	0.013
K-Y1 A1	1.166	24.0	0.047
K-Y1 A2	1.469	21.8	0.067
K-Y1 A3	1.483	25.3	0.059
K-Y3 A1	3.856	39.0	0.099
K-Y3 A2	2.144	51.2	0.042
K-Y3 A3	1.929	49.0	0.040

K-Y1は、URA3に多量コピー-GAL-yPDIを有するKHY107である。

K-Y3は、URA3に単一コピー-GAL-yPDIを有するKHY107である。

表3

株	log A T S / 1. 9 0 D	相対レベル
JRY188	18.0	1.0
JRY188/hSP-hPDI(MDEL)	27.5	1.53
JRY188/ySP-hPDI(MDEL)	29.2	1.63
JRY188/alpha-hPDI(MDEL)	21.3	1.74

実施例 19

酵母株KHY107及び酵母PDIを過剰産生する株株によるアンチステリンの分泌

K991形質転換KHY107と、酵母PDIを過剰産生する株株の形質転換株株とを増殖し、清澄化培地を、実施例17に記載のように因子Xa阻害アッセイで分泌A T Sレベルについて評価した。結果は表4に要約して示す。

A1、A2及びA3は、平行して評価した指示された株の種々のクローン単離体を示す。

酵母PDIの過剰産生の結果、菌株K-Y3-A1の場合、A T S活性の分泌が細胞当たりベースで4倍に増加し、空菌ベースで約8倍の分泌が観察される。

実施例 20

多重コピープラスミドから酵母PDI又はヒトPDIを過剰産生する酵母菌落株の構築

多重コピー酵母シャトルベクターYEp24 (Boeke & Ito, D. G., 1990, Gene, 8, pp. 17-24) は、酵母2ミクロンDNA複製起点と、ウラン無含有合成培地で選択するための酵母URA3遺伝子とを含む。YEp24をEamHIで消化し、得られた7.8 kbpのEamHIベクターフラグメントをゲル精製した(フラグメントa)。プラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADHI((#1015)をEcoRI、SphI及びSalIで消化した。その結果得られた、EAL10p-yPDI-ADHI(発酵カセットを有する2.8 kbpのEcoRI-SphIフラグメントをゲル精製した(フラグメントb)。プラスミドpUC181

を EcoRI 及び HindIII で消化し、GAL1p - MPα1 プレプロセッサ PDI 発現カセットを有する 2.8 kbp の EcoRI - HindIII フラグメントをゲル精製した (フラグメント c)。前記二つのフラグメントを平末端端化し、次いで下記の手段で互いに連結した: (1) ベクターフラグメント a 及びフラグメント b を互いに連結してプラスミド YEp 24-GAL10p-YFPDI (第 9 図) を得る: (2) ベクターフラグメント a 及びフラグメント c を互いに連結してプラスミド YEp 24-GAL1p-MPα-hPDI (第 10 図) を得る。得られた前記二つのプラスミド DNA の大規模 CsCl 製造を行った。二つの前記の形質転換反応で、酵母株 RY188 を AT5 発現ベクター K991 (実施例 16) 及び YEp 24-GAL10p-YFPDI もしくは YEp 24-GAL1p-MPα-hPDI で同時形質転換した。両方のプラスミドを含む形質転換体を、ロイシン及びウラシルの両方を欠失した合成培地で選択し、単離した単菌株 (singlet colonies) を同一培地で再ストリークしてクローン単菌株を選択した。二つの元の同時形質転換の各々について 5 個の前記クローン単菌株を、培養管内の

5 ml の 3 x YEPD 培地に接種し、細菌培養ロータードラムで 23℃ で 24 時間インキュベートした。24 時間が経過した後、ガラクトースを最終濃度 4.8% で加え、培養物を 23℃ で更に 5 日間インキュベートした。適心分離によって細胞を回収し、溶化培地と清を因子 Xa 阻害ブッセイで AT5 活性レベルについてアッセイした。YEp 24-GAL10p-YFPDI プラスミド及び AT5 発現ベクターを含む同時形質転換体は、AT5 発現ベクターのみを含む親 RY188 株と比べると、単菌株に対して 3~28 倍の分倍 AT5 活性レベルを示した。YEp 24-GAL1p-MPα-hPDI プラスミドと AT5 発現ベクターとを含む同時形質転換体は、AT5 発現ベクターのみを含む親 RY188 株と比べて、2~3 倍の分倍 AT5 活性レベルを示した。

実施例 21

前記の発現タンパク質の発現に使用した同一発現ベクターから酵母又はヒト PDI を過剰発生する酵母宿主株の構築及び評価

S. cerevisiae GAL1 及び GAL10 発

現子を、分岐型 (divergent) GAL1 及び GAL10 プロモーターとこれら二つのプロモーターの TAT A ボックスの間に位置する共通 GAL4 結合ドメインとを含む二つの構造遺伝子の間の領域から分岐的に (divergently) 転写した。プラスミド pBM272 (Johnson, M. 及び Davis, R., 1984, Mol. Cell. Biol., 4, pp. 1440) は、この分岐型原形 GAL1 - GAL10 プロモーターを 6.8 kbp の EcoRI - HindIII フラグメント c に含む (HindIII 部位に挿入した内側の BamHI 部位も有する)。このプロモーターフラグメントを使用して、分岐型プロモーターカセットベクター pUC-GAL1/10 を構築した。該ベクターは次の特性を有する: 非反復 EcoRI 及び BamHI 部位により、この順序で、酵母 ADHI 転写ターミネーター (0.9 kbp HindIII - BamHI フラグメント) から分離した酵母 GAL10 プロモーター。非反復 BamHI 及び HindIII 部位により ADHI 転写ターミネーターの第二のコピーから分離した酵母 GAL1 プロモーター。二つの ADHI ターミネーターエレメントの 3' 末端は、分岐型プロモーター

発現カセット全体を BamHI フラグメントとして単離できるように、BamHI 部位によってフランキンクされている。このプラスミド内のベクター直鎖は、ポリリンカーの代わりに別記発現カセットを有する pUC18 である。

プラスミド pUC-GAL1/10 を BamHI で消化し、ゲル精製してフラグメント 'a' を形成した。プラスミド pUC18 を BamHI で消化し、成熟ヒト PDI コーディング配列にインフレーム融合したアルファ因子プレプロリガーを有する 1.9 kbp の BamHI フラグメントをゲル精製し、ベクターフラグメント a に連結して、プラスミド pUC-GAL1/10-hPDI を得た。該プラスミドでは、アルファ因子プレプロ-hPDI 融合が GAL1 プロモーターの制御下にある。プラスミド pUC18-GAL10p-YFPDI-ADHI (実施例 13) を BamHI で消化し、その結果得られた、酵母 PDI コーディング配列を有する 1.7 kbp の BamHI フラグメントをゲル精製し、次いでベクターフラグメント a に連結して、プラスミド pUC-GAL1/10-YFPD を得た。該プラスミドでは、GAL1 プロモーターが酵母 PDI の発現を制御する。このようにして得た二つのプ

ラスミドをSacIで消化し、平滑末端化し、それぞれhPD1及びyPD1カセットを有するベクターフラグメントb及びcを得た。

ATS発現ベクター(K991)をSacI及びBglIIで消化し、成順ATSのコーディング配列にインフレーム融合したアルファ因子プロモローターを有するSacI—BglIIフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、別個の反応で二つの平滑末端化ベクターフラグメントb及びcに連結した。制限地図で調べて正確な構造を有する得られたプラスミドを、それぞれpUC-GAL1/10-hPD1/ATS(第11図)及びpUC-GAL1/10-yPD1/ATS(第12図)で消化した。これら二つのプラスミドをSphIで消化して発現カセットを遊離させ、hPD1関連又はyPD1関連発現カセットを有するフラグメントを、予めSphIで消化した酵母シャトルベクターpCI/1(Rosenberg, S.ら, 1984, Nature, 312, pp. 77-80)と連結した。その結果、二つのプラスミド、pCI/1-GAL1/10-hPD1/ATS及びpCI/1-GAL1/10-yPD1/ATSが得られた。これらのプラス

ミドでは、ATS及びPD1関連発現カセットが、それぞれGAL10及びGAL1プロモーターの制御下で同一の高コピー数ベクター上に存在していた。

次にこれら二つの発現ベクターを用いて、酵母株JRY188、BJ1995及び他の適当な酵母宿主株を形質転換した。形質転換体をロイシン無含有培地上で選択し、得られた形質転換体を、上記実施例に記載のように、ATS及びPD1の発現/分泌について評価した。

表5(下記)に示す結果から明らかなように、hPD1を過剰発現する菌株株は、pKH4α2/ATSのみを含む対照株と比べて数倍高いレベルのアンチスタチンを分泌する。また、酵母PD1を過剰発現する菌株株は、対照株と比べて3~10倍高いレベルのアンチスタチンを分泌した。

表5

菌株株	アンチスタチン (mg/L)*
<u>pCI/1-GAL1/10-yPD1/ATS</u>	
菌株株 1	4.2
菌株株 2	5.3
菌株株 3	3.9
菌株株 4	4.6
菌株株 5	5.1
<u>pCI/1-GAL1/10-hPD1/ATS</u>	
菌株株 1	3.9
菌株株 2	11.7
菌株株 3	3.8
<u>対照株</u>	
菌株株 4	26.0
菌株株 5	8.2
JRY188 対照	1.5

* 28℃で培養後5日目の収率。

実施例 2.2

PD1過剰発現酵母宿主株によるアンチスタチン分泌の増強に対する温度の効果

アンチスタチン発現ベクターpKH4α2/ATS及びYE24-GAL1p-MFA-hPD1もしくはYE24-GAL10カ-yPD1で同時に形質転換した株JRY188の導出した菌株株を、23℃又は30℃での増殖後にアンチスタチン分泌について評価した。アンチスタチン発現ベクターのみで形質転換した菌株株JRY188を平行して増殖した。3×YEHD培地で23℃又は30℃で一晩増殖した後、ガラクトースを最終濃度4.8%で加えて細胞培養物を誘導し、23℃又は30℃での適当な温度で更に5日間増殖した。誘導後3~5日で採取した培養液を、因子Xa感受アッセイにより分泌アンチスタチンレベルについて評価した。表6の結果から明らかなように、アンチスタチン発現は、PD1を過剰発現する全ての菌株株について、誘導後3日目及び5日目の両方で、温度を30℃にした時よりも23℃にした時の方が遙かに大きかった。

表6

実施例 20

菌株体	菌 座 (°C)	アンチスタシン(μg/L)	
		2 日	5 日
hPDI-1	23	0.62	2.11
hPDI-2	23	1.14	2.68
yPDI-1	23	5.93	10.25
yPDI-3	23	3.00	15.42
JRY159 対照	23	0.38	0.65
hPDI-1	30	0.49	0.47
hPDI-2	30	0.42	0.47
yPDI-1	30	2.29	4.65
yPDI-3	30	2.71	2.56
JRY159 対照	30	0.34	0.30

* 種々のhPDI菌株体は、アンチスタシン発現ベクターKH4及びYEp24-GAL10p-MPα-hPDIの両方を含んでいた。yPDI菌株体は、ベクターKH4及びYEp24-GAL10p-yPDIの両方を含んでいた。

TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム融合した真正(authentic)MPα1プレプロリーダー配列を含む第二のTAP発現ベクターpKH4-3B/TAPを構築した。合成TAP遺伝子を含むプラスミドpKH4-TAP(Neeperら, 1990, 前出引用文献)を、合成TAP遺伝子の5'末端及び3'末端をそれぞれ改変するために、下記の二つのオリゴヌクレオチドプライマー

5'-TACAAAGGTC TGTGCATCAA-3' (配列番号: 20) 及び

5'-ACTGGATCCG AATTCAGCT TAGATGCAAG CCT-3' (配列番号: 21)

を用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で、DNA断片として使用した。

該PCR反応は、当業者によく知られている方法(Jones, M. A. ら編, 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., San Diego, CA)で実施した。得られたPCR産物をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、BamHIで消化し、次いでゲル精製して、TAP

PDIを過剰発生する超換元酵母株によるマグニ抗凝血ペプチド(TAP)の分泌

マグニ抗凝血ペプチド(TAP)は、血液凝固因子Xaの強力な高選択性阻害物質である(Waxman, L. ら, 1990, Science, 248, pp. 593-596)。TAPはマグニ(Magnidin)のBa13から単離された新規のセリンプロテアーゼ阻害物質である。TAPは、6個のシステイン残基を含む60残のアミノ酸からなる(Waxmanら, 1990, 前出引用文献)。TAPは、ガラクトース誘導性GAL10プロモーターと、TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム融合した酵母MPα1プレプロリーダー配列とを含む発現ベクターpKH4-TAPを用いて、酵母内で発現された(Neeper, M. ら, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 17743-17752)。このベクターは、プレプロリーダーのアミノ酸79の位置に配置されたBamHIクローニング部位の存在に起因して、少し改変されたMPα1プレプロリーダー配列を含む(Neeperら, 1990, 前出引用文献)。

APコーディング配列の近接な5'末端に平末端を有し、塩対稱終結コドンの3'側には付着BamHI末端を有する、0.2kbpのプラントBamHIフラグメントを得た。

ベクターpKH4-3B(Hoffman, K. 及びSebulitz, L. D., 1991, Gene, 101, pp. 103-111)は、MPα1プレプロリーダーコーディング配列の3'末端に非反復SphI部位を含む。pKH4-3BをSphIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで修復して平末端端化し、BglIIで消化した。得られたプラントBglIIベクターフラグメントをゲル精製し、前述の0.2kbp プラント-BamHI-TAPフラグメントに連結して、ベクターpKH4-3B/TAPを得た。

別個の形質転換反応で、酵母株J1095、JRY158及びURIを、ベクターYEp24-GAL10p-yPDI及びpKH4-TAPもしくはpKH4-3B/TAPで同時形質転換した。両方のプラスミドを含む同時形質転換体を、ロイシン及びワラシルの両方を欠失した合成培地上で選択し、単離した単克隆を同一培地上で再ストリ

ークして、クローン単離体を選択した。種々のベクター／宿主同時形質転換の各々について三つの前記クローン単離体を、培養管内の3mlの4%グルコース含有ウラシル欠失改質 λ leu⁺噬体(る λ leu⁺Ura⁺)に接種した。宿主菌物を組織培養ローラードラム内で30℃で24時間インキュベートした。24時間が経過した後、細胞を遠心分離によって回収し、4%ガラクトースを含む5mlの λ leu⁺Ura⁺噬体に最悪菌させた。得られに培養物を30℃で更に48時間インキュベートした。次いで細胞を遠心分離によって回収し、清澄化培養試料をSCX-MPLC又は因子Xa基質アッセイにより分泌TAPレベルについて評価した(Waxmanら、1990、所出引用文献)。別の方法として、培養酵母細胞を23℃で24時間増殖し、ガラクトースを最終濃度4%で加えることにより誘導し、次いで23℃で更に5日間インキュベートした。次いで、清澄化培養試料を前述のように分泌TAPレベルについて評価した。

配列番号: 3

配列の長さ: 6 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Trp Cys Gly Pro Cys Lys
1 5

配列番号: 4

配列の長さ: 10 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys
1 5 10

配列番号: 5

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 6 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Trp Cys Gly His Cys Lys
1 5

配列番号: 2

配列の長さ: 4 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

His Asp Glu Leu
1

配列の長さ: 30 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

CTTACAGTGA CCACACCATG GAGCGTAGAA

30

配列番号: 6

配列の長さ: 26 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

AAATGCGGCC GCAAGCTTGC GGCCTGC

28

配列番号: 7

配列の長さ: 26 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

16CTGGGGCC GCTAGCTTGC GGCCGC 28

配列番号：3

配列の長さ：15塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATTTCCTTGA CGCCC 15

配列番号：9

配列の長さ：15塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

TGGGGGGCT CCGCGCGAC CAGCGCGAG GACGCGAGC AGAGCAGAGT CGCGCGAGC 40
ATTTTGTCT GTG 73

配列番号：12

配列の長さ：88塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GATCGAGAA AGAATATGA GTTCTCTCT CCGCGCGAGT TGTATGATG CTGCTCTGTG 60
CTGCTCTGT GTTCTCTCT CAGCGCGC 98

配列番号：13

配列の長さ：88塩基対

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA

配列

TGGGGGGCT CAGCG 15

配列番号：10

配列の長さ：73塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GATCGAGAA AGAATATGA GTTCTCTCT CCGCGCGAGT TGTATGATG CTGCTCTGTG 60
CTGCTCTGT GTTCTCTCT CAGCGCGC 73

配列番号：11

配列の長さ：73塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

TGGGGGGCT CCGCGAGAG AGAGCGCGC AGAGCGAGC AGAGCGAGC CAGCGCGC 60
CAGCGAGAG AGAGCGAGC GTTCTCTG 90

配列番号：14

配列の長さ：91塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GATCGAGAG AGAGCGAGC AGAGCGAGC CAGCGAGC CAGCGAGC CAGCGAGC 60
AGAGCGAGC AGAGCGAGC AGAGCGAGC 91

配列番号：15

配列の長さ: 95塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

AATTGGGATG CTATAGATTC ATGCTGCAGC CATTGCTGGT CATGCTCTTC
CTGGGATGCT GAGCTGCTCG CTGCTGCAG CTGCTGCAGG TGGC

30

95

配列番号: 16

配列の長さ: 81塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

GATCCACAAA ACAAAATGAA GTTTCTGCT G

31

配列番号: 17

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

TATAAGATCC TTAATGATAAG CGTGGGATAA GCTT

34

配列番号: 20

配列の長さ: 20塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

TTCACCGCTC TGTGCATCA

39

配列番号: 21

配列の長さ: 33塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 31塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

GCACACGAG AAAACTGAT TTGTGTTGT G

31

配列番号: 18

配列の長さ: 51塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

AGATGATGC TGTCTTGGA TAAAGAGAA GAGGATTC GACCGGCTG T

32

配列番号: 19

配列の長さ: 34塩基対

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

ACTGGATCCG AATTCAAGCT TGGATGCAAG CGT

33

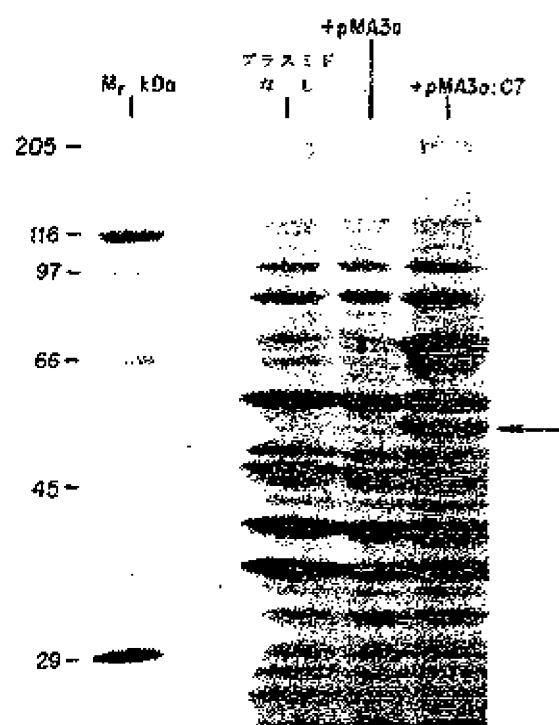


FIG. 1

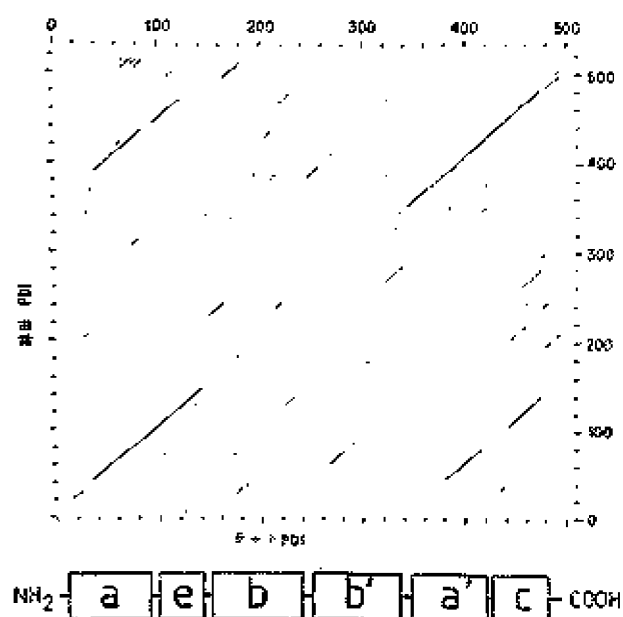


FIG. 2

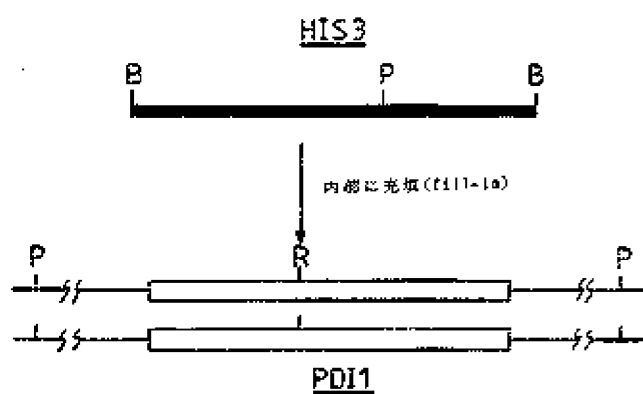


FIG. 3a



FIG. 3b

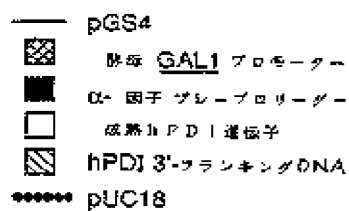
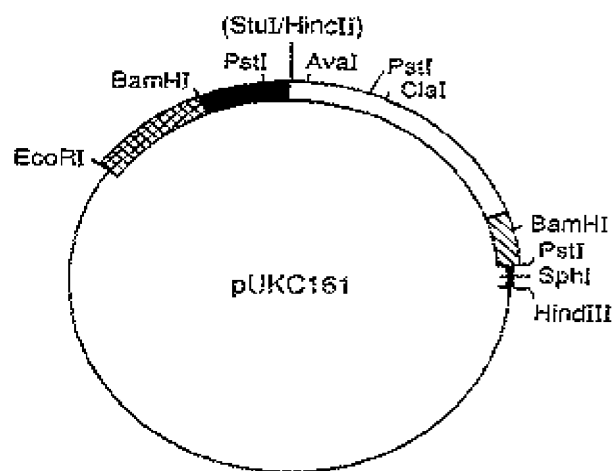


FIG. 4

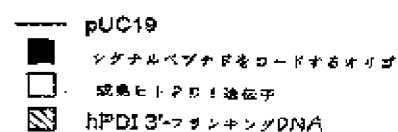
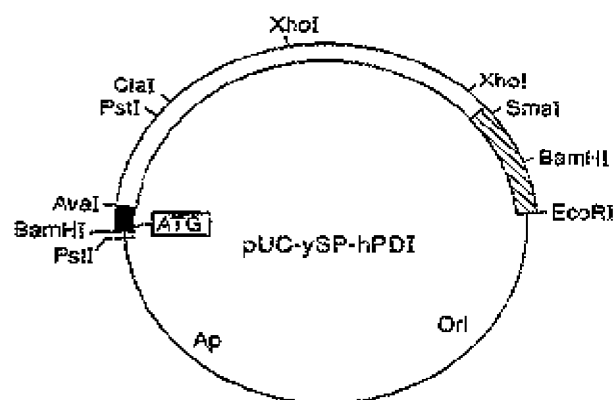


FIG. 5

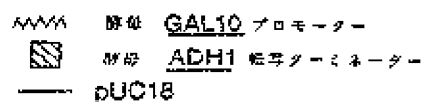
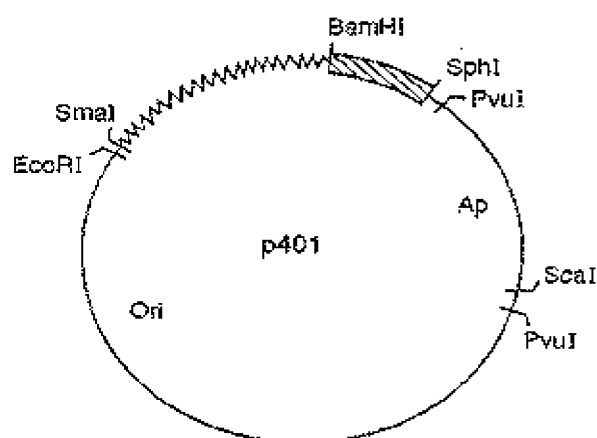


FIG. 6

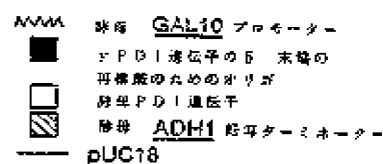
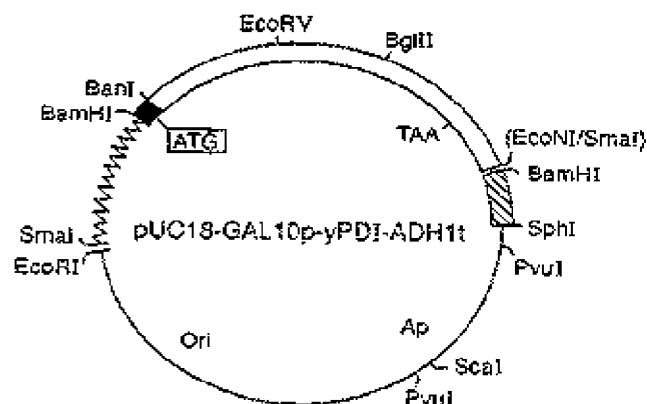


FIG. 7

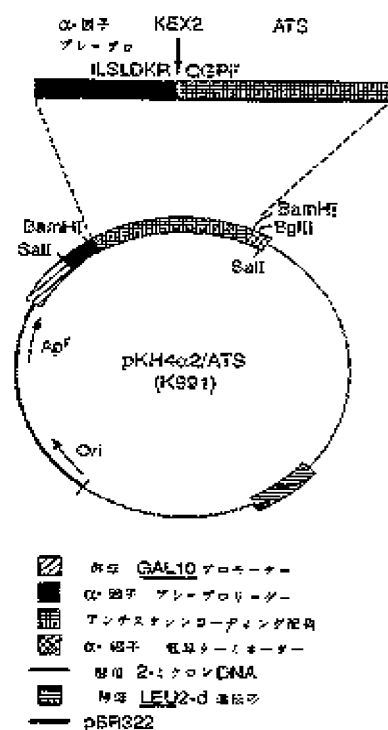


FIG. 8

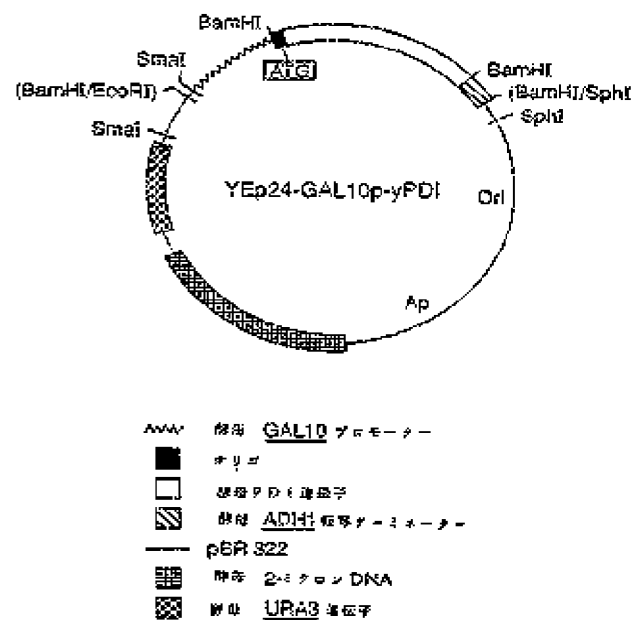


FIG. 9

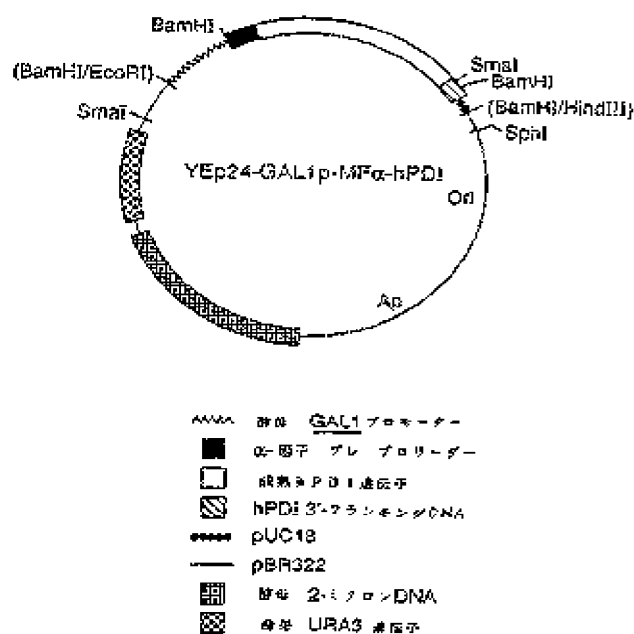


FIG. 10

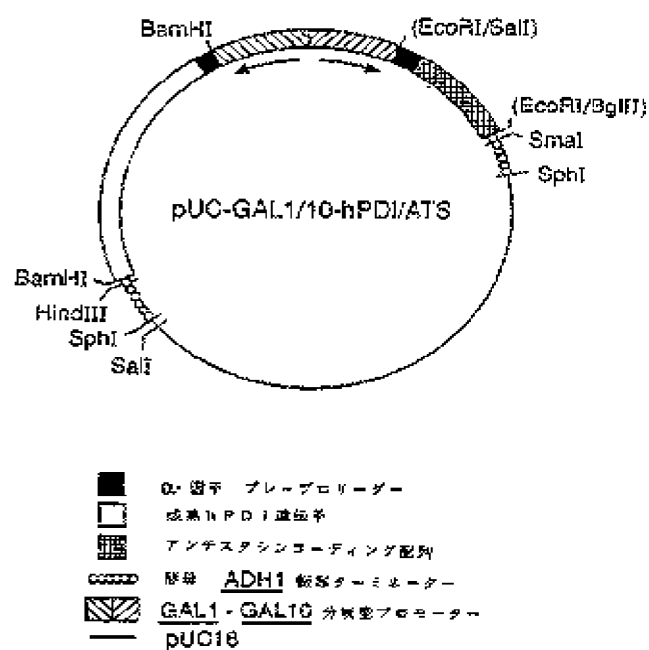
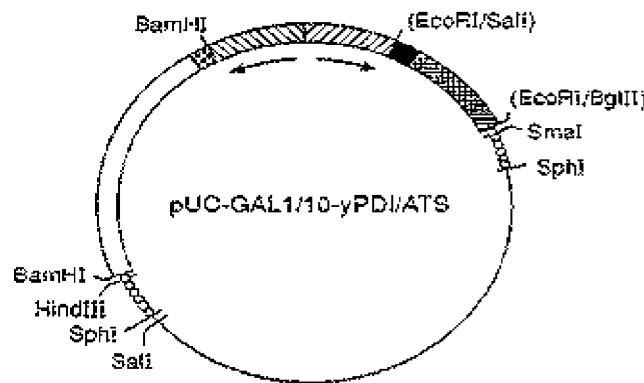


FIG. 11










-  オリZ
 染色体ヨリ：コーディング配列
 Q₊ 因子 プレ プロリダー
 アンチヌタシンコーディング配列
 GAL1 - GAL10 分岐型プロモーター
 解糖 ADHI 転写ターミネーター
 pUC18

FIG. 12

[illegible]

CROSS-REFERENCES CITED TO BE RELEVANT		International Specimen No. ref. (year of issue)
Category	The use of documents and references where appropriate of the relevant passages	References to class No.
Y	Gene, Vol. 7, issued 1995, Schrems et al., "Characterization of the sequence of the yeast PCL313 gene localized on chromosome III. Homology with the protein disulfide isomerase PDI gene product of other organisms", pages 585-590. See above article.	1-34
Y	EP, A. 0,190,953 (Toyoshima et al.) 07 December 1986. See examples 2 and 3 especially.	9
Y	The EMBO Journal, Vol. 6, No. 3, Römgen et al., "Molecular cloning of the beta-chain of human prolyl 4-hydroxylase. The isoform and protein disulfide isomerase are products of the same gene", pages 643-649. See the Abstract on page 643 especially.	17, 18, 21, 22, 31
Y	Gene, Vol. 75, issued 1989, Han et al., "Cloning and expression of cDNA encoding avian, a beta-chain protein having anti-coagulant and anticoagulant properties", pages 47-57. See page 47 and 55 especially.	34, 39
Y	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 26, issued 15 October 1990, Hester et al., "Characterization of recombinant oak anticoagulant peptide: A highly selective inhibitor of blood coagulation factor Xa", pages 17746-17752. See pages 17750 and 17751 especially.	15, 31

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 4	識別記号	序内整理番号	F I
// (C 1 2 P 21/92			
C 1 2 R 1:865)			
(C 1 2 N 1/19			
C 1 2 R 1:865)			
(C 1 2 N 9/90			
C 1 2 R 1:865)			

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, KZ, LK, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US

(72) 発明者 トウイート, マイケル・エフ
イギリス国, ケント・シー・テイー・4・
7・エヌ・ビー, チャータム・ハッチ, ナ
イティンゲイル・クロース・3

(72) 発明者 フリードマン, ロバート・ビー
イギリス国, ケント・シー・テイー・1・
1・エツクス・アール, カンタベリー, セ
ント・オーガスティンズ・ロード・43

(72) 発明者 シェルツ, ローレン・デイー
アメリカ合衆国, ペンシルバニア・19438,
ハーリーズビル, オーク・ドライブ・421

(72) 発明者 エリス, ロナルド・ダブリュ
アメリカ合衆国, ペンシルバニア・19066,
メリオン, シカモア・アベニュー・206

(72) 発明者 マークス, ヘンリー・ゼット
アメリカ合衆国, ペンシルバニア・19095,
ウインコート, ソーンベリー・ロード・
1517

(72) 発明者 モンゴメリー, ドナ・エル
アメリカ合衆国, ペンシルバニア・18914,
デヤルフオント, ヒツコリー・レーン・9